

AVALIAÇÃO DE HIDROLISADOS DE COLÁGENO ASSOCIADO COM GLICEROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE MELÕES

Christian dos Santos Meurer^{1*}

Gustavo Henrique Santos Flores Ponce^{2*}

Resumo

Neste trabalho os melões foram cortados em cubos de 8 cm³ e impregnados com crioprotetores para melhorar sua tolerância ao congelamento. Os melões foram impregnados com soluções de glicerina 10% (m/v), hidrolisado de colágeno 1% (m/v), hidrolisado de colágeno 1% com glicerina a 5% (m/v), hidrolisado de colágeno 1% com glicerina a 10%, hidrolisado de colágeno 2% com glicerina a 5% e hidrolisado de colágeno 2% com glicerina a 10%, utilizando o método de impregnação a vácuo. Os frutos foram congelados em freezer doméstico a -18 °C e descongelados em estufa a 35 °C antes de serem avaliados quanto à perda por gotejamento. As rupturas do tecido causadas pelo crescimento de cristais de gelo foram visualizadas por microfotografias obtidas por microscopia ótica. Os resultados mostraram que os efeitos combinados de ambos os crioprotetores melhoraram significativamente a tolerância ao congelamento dos melões tratados. O efeito da crioproteção foi influenciado pela hidrólise do colágeno e por sua concentração na matriz.

Palavras-Chave: Proteína Anticongelante. Melão. Pepsina. Crioprotetor. Perda Por Gotejamento.

EVALUATION OF COLLAGEN HYDROLYSATES ASSOCIATED WITH GLYCEROL IN MELON CRYOPRESERVATION

Abstract: In this work the melons were cut into 8 cm³ cubes and impregnated with

^{1*} Acadêmico do curso superior de tecnologia de processos químicos do Instituto Federal de Santa Catarina, christiancsm7@gmail.com.

^{2*} Docente do Instituto Federal de Santa Catarina, gustavo.ponce@ifsc.edu.br

cryoprotectants to improve their freezing tolerance. The melons were impregnated with solutions of glycerin 10% (w/v), collagen hydrolyzate 1% (w/v), collagen hydrolyzate 1% with 5% glycerin (w/v), collagen hydrolyzate 1% with 10% glycerin, collagen hydrolyzate 2% with 5% glycerine and collagen hydrolyzate 2% with 10% glycerine, using the vacuum infusion method. The fruits were frozen in a domestic freezer at -18 °C and thawed in a drying oven at 35 °C before being evaluated for drip loss. Tissue ruptures caused by the growth of ice crystals were visualized by microphotograph obtained by optical microscopy. The results showed that the combined effects of both cryoprotectants significantly improved freezing tolerance of treated melons. The cryoprotection effect was influenced by collagen hydrolysis and its concentration in the matrix.

Keywords: Antifreeze Protein. Melon. Pepsin. Cryoprotectant. Drip loss.

1 INTRODUÇÃO

O congelamento é um dos melhores e mais antigos métodos disponíveis para a conservação de alimentos. A disponibilidade de congeladores em toda a cadeia de frios melhorou consideravelmente a conservação e a distribuição de alimentos congelados (ORDÓÑEZ, 2005). Contudo, se por um lado as temperaturas negativas reduzem a velocidade das reações químicas e o crescimento de microrganismos, por outro, o crescimento exagerado dos cristais de gelo podem resultar em danos à membrana e parede celular, alterando de forma significativa as características originais dos alimentos, principalmente os de origem vegetal (PROVESI; AMANTE, 2015).

Uma classe de proteínas encontrada pela primeira vez em peixes de águas frias surgiu como uma alternativa para este problema, demonstrando a capacidade de influenciar o crescimento do cristal de gelo. Devido a essa propriedade, foram denominadas proteínas anticongelantes (PACs). Em estudos posteriores, proteínas diferentes mas com a mesma capacidade também foram identificadas em uma gama de animais, plantas, fungos e bactérias, todos eles sobrevivendo em ambientes de baixas temperaturas (EWART et al., 1999; CAI et al., 2011).

Um grupo dessas proteínas anticongelantes demonstrou ter uma capacidade de inibir, ou pelo menos dificultar, o processo de recristalização migratória. Esse processo é o de maior importância nos alimentos congelados, pois ele ocorre quando um cristal cresce à custa de um menor, devido às flutuações de temperatura (ORDÓÑEZ, 2005). A inibição dos processos de recristalização não dependem de elevadas concentrações de PACs na matriz, demonstrando serem efetivas em concentrações de $26 \mu\text{g L}^{-1}$ (ZHANG et al., 2004). É grande a variedade de PACs já identificada; o desafio, entretanto, é a sua extração, purificação e identificação de qual peptídeo tem melhor aproveitamento em cada matriz (CREVEL, 2002; GRIFFITH; EWART, 1995). Assim, é necessário encontrar fontes alternativas de PACs para controlar o crescimento dos cristais e melhorar a qualidade dos alimentos congelados durante o armazenamento e transporte.

Damodaran (2007), avaliou que peptídeos de colágeno de uma certa faixa de peso molecular eram capazes de inibir a recristalização de uma mistura de sorvete. Assim, confirmando, que o hidrolisado de colágeno pode ser uma fonte econômica e viável de proteínas anticongelantes, e que podem ser produzidas em grandes quantidades e com custo relativamente baixo.

O colágeno é uma proteína longa e fibrosa que é abundante em mamíferos, responsável em média por 30% da massa total de proteínas do animal. Vinte e oito tipos de colágenos já foram identificados e o colágeno tipo I compõe em torno de 90% do colágeno presente nos animais (RICARD-BLUM, 2010). A sua principal função é dar ao tecido resistência à força, estando presente principalmente em tecidos fibrosos como pele, vasos sanguíneos, tendões, músculos e outros. As degradações do colágeno estão ligadas a vários distúrbios e síndromes, como osteoartrite, dores nas articulações e fraqueza muscular (HONG et al., 2019). Vários estudos relatam que a ingestão dos hidrolisados de colágeno, além de aliviar dores, fraqueza e outros distúrbios, exerce também vários outros efeitos benéficos a saúde, como a melhora da elasticidade e hidratação da pele, também alivia marcas do envelhecimento e aumenta a concentração de hemoglobina no sangue (PROKSCH et al., 2014, SCHWARTZ & PARK, 2012).

Uma das fontes de extração do colágeno é proveniente dos suínos, onde a característica mais proeminente desse colágeno é sua sequência de repetição de tripeptídeos, representada como $(\text{Gly-Z-X})_n$, onde X é qualquer resíduo de aminoácido e Z sempre ocupado por uma Prolina ou uma Hidroxiprolina (CAO et al., 2015). Essas

unidades repetitivas são muito semelhantes às sequências de repetição Gly-W-X encontradas em duas proteínas anticongelantes das pulgas da neve (*Hypogastrura harveyi*), onde W é um aminoácido de cadeia lateral pequena e o X bastante variável (GRAHAM; DAVIES, 2005). Assim, é concebível que as sequências repetidas de -Gly-Z-X- nos peptídeos de colágeno possam desempenhar alguma atividade na proteção das microestruturas celulares, tornando-se um crioprotetor.

O termo crioprotetor é usado para designar um aditivo que oferece à célula uma sobrevivência após o descongelamento maior do que a sobrevivência dela na mesma situação, sem a sua presença. Costuma-se dividir os crioprotetores de acordo com seu mecanismo de ação: agentes de nucleação de gelo, PACs e solutos compatíveis (FULLER, 2004). Os agentes de nucleação interagem com a água livre e modificam a formação dos cristais, evitando o crescimento deliberado de gelo em alguns locais. Esses agentes possuem efeito mais pronunciado em células avulsas e não tanto em tecidos. Os solutos compatíveis são geralmente açúcares e álcoois, como a trealose e o glicerol (1,2,3-propanotriol) (FULLER, 2004).

O glicerol age no tecido aumentando o volume de canais de solventes descongelados, diluindo as altas concentrações de sais durante o processo de congelamento e interagindo com as paredes celulares, impedindo a desidratação das células (SQUIRES et al., 1999). Crioprotetores como glicerol e trealose, quando utilizados, necessitam estar em altas concentrações, muitas vezes interferindo nos aspectos sensoriais do alimento e inviabilizando seu uso.

Uma alternativa a ser avaliada é o uso associado de hidrolisados de colágeno com crioprotetores tradicionais como o glicerol, reduzindo a quantidade necessária do segundo. Sendo assim, diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar um potencial efeito crioprotetor de hidrolisados do colágeno e do glicerol, associados ou não, na qualidade de melões congelados ao longo de 1, 7, 14 e 15 dias.

2 METODOLOGIA

2.1 Hidrólise do colágeno

A gelatina (Sigma-Aldrich, CAS: 9000-70-8) foi hidrolisada pela enzima pepsina (mucosa gástrica suína, Sigma-Aldrich, CAS: 9001-75-6) utilizando o método proposto por Du & Betti (2016), com adaptações. O estudo foi realizado com dois experimentos, que foram chamados de Experimento I e Experimento II, onde se diferenciam pelo pH

da solução e pela quantidade de enzima utilizada para digerir o colágeno. Foram preparadas duas soluções de gelatina nas concentrações de 0,08 g/mL usando ácido acético 0,5 M. Para o Experimento I o pH da solução foi ajustado para 3,3 e para o Experimento II, pH 2,5. O ajuste do pH foi realizado utilizando ácido acético glacial (PA). Em seguida as soluções foram aquecidas em banho térmico a 80 °C por 15 min para desativação de enzimas endógenas. Após o resfriamento a 37 °C, foram preparadas no momento do uso 10 mL de solução de pepsina 33,2 mg/mL em solução de ácido acético 0,5 M para o Experimento I e 20 mL de solução de pepsina 45 mg/mL em solução de ácido acético 0,5 M para o Experimento II. Estas foram adicionadas as suspensões de colágeno e mantidas em banho térmico a 37 °C durante 6 horas, com agitações periódicas a cada 10 minutos. Logo depois da digestão, para inativação da pepsina, as soluções foram aquecidas a 90 °C durante 15 min e então resfriadas em banho de gelo por mais 15 min. As soluções foram neutralizadas utilizando solução de NaOH 7 e 30% (m/v) e, na sequência, congeladas. As hidrólises foram realizadas em dias diferentes.

2.2 Preparo das amostras e soluções

Os melões da marca Melícia foram adquiridos em um mercado local (Lages - Santa Catarina). O corte das amostras foi feito paralelamente ao eixo axial do melão. As sementes foram retiradas juntamente com 2 mm de casca para então serem cortados cubos de 2 cm de aresta. Foram preparadas soluções de glicerina 10% (m/v), hidrolisado de colágeno 1% (m/v), hidrolisado de colágeno 1% com glicerina a 5% (m/v), hidrolisado de colágeno 1% com glicerina a 10%, hidrolisado de colágeno 2% com glicerina a 5% e hidrolisado de colágeno 2% com glicerina a 10%.

2.3 Impregnação a Vácuo.

A impregnação a vácuo foi realizada com base nos resultados de testes preliminares, utilizando a metodologia de Kunsler (2017), com adaptações. Foram pesados 750g de melão para cada ensaio, e colocados na câmara do dessecador. Em seguida, foi adicionado 600 mL da solução a ser impregnada, de modo que a amostra ficou totalmente coberta. O sistema foi fechado e um vácuo de -650 mmHg foi aplicado por 5 min, deixando 5 min de repouso a pressão atmosférica, aplicado mais 1 min de vácuo e 1 min de repouso.

2.4 Congelamento e Descongelo

Os cortes cúbicos foram separados em porções de 70g de melão para o Experimento I e 3 cubos de melão para o Experimento II. Após serem devidamente embalados em sacos plásticos de polietileno, estes foram congelados seguindo o método de congelamento em ar estático (AE), utilizando um freezer doméstico com temperatura do ar de -18 ± 2 °C. As amostras congeladas foram retiradas dos sacos e colocadas dentro de um funil de buchner acoplado a uma proveta. Em seguida o sistema funil proveta foi coberto e vedado com filme plástico para evitar perda de fluido por evaporação. As amostras foram deixadas em estufa a 35 °C por duas horas. O Experimento I foi realizado em triplicata, enquanto que o Experimento II, para evitar erros estatísticos, foi feito em quintuplicata.

2.5 Microscopia

O dano mecânico causado na estrutura celular foi avaliado por microscopia ótica convencional seguindo o método utilizado por Resende e Cal-vita (2002), com adaptações. As amostras congeladas foram colocadas em uma solução fixativa (álcool etílico absoluto: formaldeído 38%: água, 45: 10: 45) pré-resfriada a -18 °C. Uma vez fixadas, a desidratação e emblocamento das amostras foram realizados seguindo a Tabela 1. Os cortes foram feitos em micrótopo rotativo com seções de 12 micrômetros, corados com fucsina básica e fotografados com celular (Xiaomi Redmi Note 8).

Tabela 1 - Técnica de emblocamento utilizado em frutos carnosos.

Temperatura Ambiente	Tempo de Exposição (min)
Álcool 70 °GL	15
Álcool 80 °GL	30
Álcool 90 °GL	30
Álcool 100 °GL	60
Álcool 100 °GL	60
Álcool 100 °GL : Xilol (3:1 v/v)	30
Álcool 100 °GL : Xilol (1:1 v/v)	30
Álcool 100 °GL : Xilol (1:3 v/v)	30
Temperatura 60 °C	
Xilol I	15
Xilol II	15

2.6 Variação de Massa após Descongelamento (Perda por Gotejamento)

A perda por gotejamento foi determinada de acordo com o método proposto por Velickova et al. (2013), com adaptações. Foi registrado a massa da amostra antes do congelamento e após descongelamento. A perda de massa em porcentagem foi calculada a partir da seguinte equação: $[(m_1 - m_2) / m_1] * 100$, onde m_1 é a massa inicial e m_2 a massa final.

2.7 Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e quintuplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias de Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Perda de fluido após descongelamento

Os resultados de perdas de fluido por descongelamento, estão presentes nas Tabela 2 e Tabela 3. De todas as amostras congeladas no Experimento I, somente a impregnada com hidrolisado de colágeno e glicerina demonstrou ter efetividade na redução de perda de líquido por gotejamento, sendo diferente da amostra impregnada com água, mas não diferente da amostra sem tratamento. Em comparação com o Experimento II, os resultados sugerem que o colágeno do Experimento I, menos hidrolisado, não é tão eficiente na proteção celular quanto o que foi mais hidrolisado, já que no primeiro dia do Experimento II todos os ensaios tratados com crioprotetores se mostraram diferentes da amostra sem impregnação e impregnada com água. Os melões que continham os dois crioprotetores perderam em média $18,66 \pm 7$ % de massa no Experimento I, valores que são próximos aos encontrados por Velickova et al. (2013) ao estudar o efeito crioprotetor da trealose associado com extrato de grama de trigo de inverno climatizado a frio, onde a perda foi de $12,1 \pm 1$ %. Durante o Experimento I, os ensaios não se mostraram diferentes estatisticamente após 7 e 14 dias.

No primeiro dia do Experimento II, a atividade conjunta dos crioprotetores se

mostraram eficientes em quaisquer concentrações, e não diferentes entre si. No sétimo dia, a diferença dos que possuíam crioprotetores com o impregnado com água continuou presente, entretanto, somente a amostra impregnada com hidrolisado 2% e glicerina 10% teve uma diferença significativa dos controles, apresentando uma perda média de $11,4 \pm 4,2\%$.

A solução contendo somente o hidrolisado não demonstrou atividade crioprotetora, provavelmente devido ao acetato de sódio que foi originado na neutralização, este, por sua vez, aumenta a concentração do fluido extracelular, fazendo com que a célula perca água para o meio. A água começa sua cristalização no espaço extracelular causando danos mecânicos às células (Velickova, 2013). O fluido impregnado ocupa os espaços intercelulares da fruta, o que aumenta o número de moléculas de água disponível para o crescimento do cristal. Uma outra possível causa é o tamanho dos peptídeos, que demonstram atividade crioprotetora na faixa de 2000 - 5000 Da (DAMODARAN, 2007). A impregnação com glicerina pode não ter sido efetiva devido a concentração da solução, já que os crioprotetores caracterizados como solutos compatíveis necessitam de altas concentrações no meio intercelular.

O Experimento II demonstrou ter uma maior inibição da recristalização, o que era esperado, devido a uma possível redução no tamanho dos peptídeos obtidos na hidrólise. Ao reduzir o pH, a pepsina passa a ter um meio mais favorável à sua atividade, resultando assim em mais hidrólises e conseqüentemente uma chance maior de apresentar peptídeos adequados para a criopreservação. No tratamento impregnado com hidrolisado de colágeno 1% com glicerina 10% do Experimento II o meio para a hidrólise sendo mais favorável, fez com que a perda de massa se aproximasse ainda mais dos valores encontrados por Velickova et al. (2013), perdendo em média $13,3 \pm 1,7\%$.

Tabela 2 - Tratamentos do Experimento I e média de massa perdida e desvio padrão após descongelamento.

Tratamento	Massa perdida dia 1	Massa perdida dia 7	Massa perdida dia 14
S/ impregnação	$20,5^a \pm 3,1$	$13,4^a \pm 3,3$	$23,5^a \pm 7,6$
impreg. Água	$40,7^b \pm 1,4$	$26,0^a \pm 4,2$	$34,1^a \pm 2,4$
impreg. Hidro. 1%	$27,8^{ab} \pm 4,8$	$15,4^a \pm 3,$	$25,9^a \pm 4,5$
impreg. Glice. 10%	$24,0^{ab} \pm 8,2$	$21,7^a \pm 8,$	$33,5^a \pm 1,8$
impreg. Hidro. 1% + Glice. 10%	$18,7^a \pm 7,0$	$17,5^a \pm 3,7$	$27,9^a \pm 3,7$

Tabela 3 - Tratamentos do Experimento II e média de massa perdida e desvio padrão após descongelamento.

Tratamento	Massa perdida dia 1	Massa perdida dia 7	Massa perdida dia 15
S/ impregnação	24,7 ^b ± 2,2	17,3 ^b ± 3,6	12,5 ^a ± 4,5
impreg. água	28,0 ^b ± 4,9	23,8 ^c ± 1,7	25,9 ^b ± 3,7
impreg. Hidro. 1% + Glice. 10%	13,3 ^a ± 1,7	13,7 ^{ab} ± 1,2	12,1 ^a ± 1,7
impreg. Hidro. 1% + Glice. 5%	15,4 ^a ± 2,7	15,4 ^{ab} ± 1,3	12,7 ^a ± 2,2
impreg. Hidro. 2% + Glice. 10%	14,2 ^a ± 3,1	11,4 ^a ± 4,2	14,0 ^a ± 5,0
impreg. Hidro. 2% + Glice. 5%	13,7 ^a ± 3,4	12,9 ^{ab} ± 2,3	12,5 ^a ± 2,6

3.2 Análise microestrutural

Para o Experimento I a Figura 1 mostra os danos causados na parede celular pelo crescimento do cristal de gelo após 7 dias de congelamento. As fotos demonstram que a glicerina foi o crioprotetor que mais protegeu a integridade física da célula, provavelmente devido a ausência do acetato de sódio e pelas suas interações com a parede celular. Entretanto, é necessário um estudo mais detalhado, visto que durante o presente estudo só foi possível a confecção de uma lâmina para todos os ensaios do sétimo dia. Comparando a amostra sem impregnação com a impregnada com água, pode-se ver danos maiores no segundo, demonstrando que o crescimento extracelular é mais danoso a célula que o intracelular. A microscopia da amostra impregnada com hidrolisado e glicerina demonstra que, em algumas regiões, o crescimento do cristal causou mais dano que em outras. Uma possível causa desse resultado é que, após a ruptura, a sacarose contida dentro da célula se dispersa no meio intercelular e passa a ter uma atividade crioprotetora junto com a glicerina e o hidrolisado.

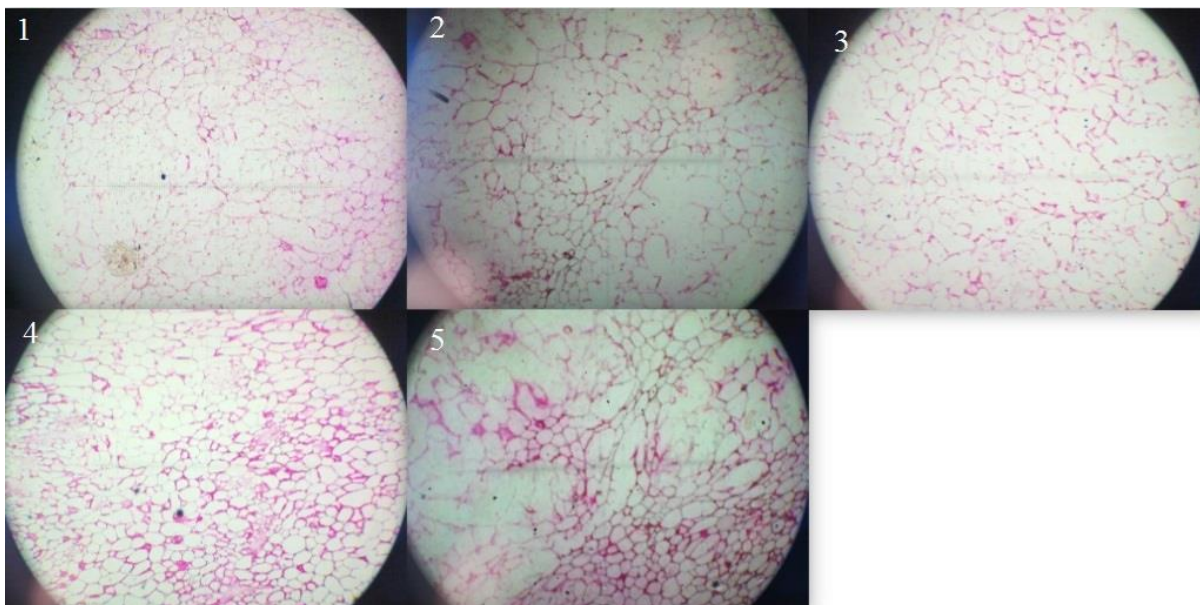


Figura 1. Análise do dano mecânico na estrutura celular para (1) sem impregnação, (2) impregnado com água, (3) impregnado com hidrolisado de colágeno, (4) impregnado com glicerina e (5) impregnado com hidrolisado mais glicerina (FONTE: O autor, 2019).

4 CONCLUSÃO

Os efeitos combinados do hidrolisado de colágeno e glicerina melhoraram significativamente a tolerância de melões ao congelamento, apresentando uma sinergia. O efeito da crioproteção foi influenciada pelo número de hidrólises que o colágeno sofreu e pela quantidade de peptídeos na matriz. Os resultados são positivos e atraentes, pois a possível aplicação na indústria, principalmente a local, do colágeno hidrolisado como um crioprotetor de sorvetes, frutas e outras matrizes passa a ser economicamente mais viável. O melhor resultado encontrado foi de hidrolisado 2% com glicerina a 10%, que demonstrou ser efetivo durante 7 dias, diferente dos outros combinados que perderam atividade em dias anteriores.

Estudos futuros poderão contemplar eletroforese, análise de textura e um estudo mais detalhado da microscopia, pois no presente trabalho a realização de algumas etapas não foi possível, devido a falta de alguns reagentes como poliacrilamida e kit de marcadores de peso e de um equipamento sensível o suficiente para a determinação da textura. Uma análise sensorial também pode ser realizada caso a matriz seja um alimento naturalmente vendido congelado, como por exemplo o sorvete.

5 REFERÊNCIAS

CAI, Yujie et al. Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 89, n. 2, p.98-102, abr. 2011. Elsevier BV.

CAO, Hui et al. Antifreeze and cryoprotective activities of ice-binding collagen peptides from pig skin. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 194, p.1245-1253, mar. 2016. Elsevier BV.

CHEUNG, Imelda W.y.; LI-CHAN, Eunice C.y.. Enzymatic production of protein hydrolysates from steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin as inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin-I converting enzyme. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 28, p.254-264, jan. 2017. Elsevier BV.

CREVEL, R.w.r; FEDYK, J.k; SPURGEON, M.j. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 40, n. 7, p.899-903, jul. 2002. Elsevier BV.

CRUZ, Rui M.s.; VIEIRA, Margarida C.; SILVA, Cristina L.m.. The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: Effect of an antifreeze protein type I. **Journal Of Food Engineering**, [s.l.], v. 95, n. 2, p.339-345, nov. 2009. Elsevier BV.

DAMODARAN, Srinivasan. Inhibition of Ice Crystal Growth in Ice Cream Mix by Gelatin Hydrolysate. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 26, p.10918-10923, dez. 2007. American Chemical Society (ACS).

DU, Lihui; BETTI, Mirko. Chicken collagen hydrolysate cryoprotection of natural actomyosin: Mechanism studies during freeze-thaw cycles and simulated digestion. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 211, p.791-802, nov. 2016. Elsevier BV.

EWART, K. V.; LIN, Q.; HEW, C. L.. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. **Cellular And Molecular Life Sciences Cmls**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.271-283, fev. 1999. Springer Science and Business Media LLC.

GRAHAM, L. A.. Glycine-Rich Antifreeze Proteins from Snow Fleas. **Science**, [s.l.], v. 310, n. 5747, p.461-461, 21 out. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

GRIFFITH, Marilyn; EWART, K. Vanya. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. **Biotechnology advances**, v. 13, n. 3, p. 375-402, 1995.

HONG, Hui et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 301, p.125222-, dez. 2019. Elsevier BV.

KIM, Sam Sun et al. Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (*Halocynthia roretzi*) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 25, p.128-133, out. 2018. Elsevier BV.

KUNSLER, Nicole Luíse Froehlich. **Estudo da Impregnação a Vácuo de Trealose como Crioprotetor em Morangos**. 2017. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

LIN, Jun et al. Antioxidant and cryoprotective effects of hydrolysate from gill protein of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in preventing denaturation of frozen surimi. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 298, p.124868-124867, nov. 2019. Elsevier BV.

PARK, Joosang; SCHWARTZ. Ingestion of BioCell Collagen®, a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract; enhanced blood microcirculation and reduced facial aging signs. **Clinical Interventions In Aging**, [s.l.], p.267-, jul. 2012. Dove Medical Press Ltd..

PROKSCH, E. et al. Oral Supplementation of Specific Collagen Peptides Has Beneficial Effects on Human Skin Physiology: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Skin Pharmacology And Physiology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.47-55, 2014. S. Karger AG.

PROVESI, João Gustavo; AMANTE, Edna Regina. Revisão: Proteínas anticongelantes – uma tecnologia emergente para o congelamento de alimentos. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.2-13, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

PROVESI, João Gustavo et al. Extraction of antifreeze proteins from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* and their application to star fruit (*Averrhoa carambola*) freezing. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 289, p.65-73, ago. 2019. Elsevier BV.

RESENDE, Jaime V.; CAL-VITA, José. FRUTOS DE MELÃO SUBMETIDOS A PRÉ-TRATAMENTOS COM HIDROCOLÓIDES: EFEITOS DO PROCESSO DE CONGELAMENTO SOBRE A MICROESTRUTURA CELULAR. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - Sp, v. 3, n. 22, p.295-304, set. 2002.

TACHIBANA, Yuki et al. Antifreeze Glycoproteins: Elucidation of the Structural Motifs That Are Essential for Antifreeze Activity. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 43, n. 7, p.856-862, 6 fev. 2004. Wiley.

VELICKOVA, Elena et al. Effect of vacuum infused cryoprotectants on the freezing tolerance of strawberry tissues. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 52, n. 2, p.146-150, jul. 2013. Elsevier BV.

VELICKOVA, Elena et al. Effect of pulsed electric field coupled with vacuum infusion on quality parameters of frozen/thawed strawberries. **Journal Of Food Engineering**, [s.l.], v. 233, p.57-64, set. 2018. Elsevier BV.

WANG, Shaoyun; AGYARE, Kingsley; DAMODARAN, Srinivasan. Optimisation of hydrolysis conditions and fractionation of peptide cryoprotectants from gelatin hydrolysate. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 115, n. 2, p.620-630, jul. 2009. Elsevier BV.

WANG, Wenlong et al. Hypothermia protection effect of antifreeze peptides from pigskin collagen on freeze-dried *Streptococcus thermophiles* and its possible action mechanism. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.878-885, out. 2015. Elsevier BV.

ZHANG, Dang-quan et al. Expression, purification, and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.257-263, jun. 2004. Elsevier BV.

