

CLÉCIA DA SILVA CARNEIRO

**ESTRUTURAÇÃO E MORFOLOGIA DE CRISTAIS DE
GELO SOB A INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES E
COMBINAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS DIVERSAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos, para obten-
ção do grau de Mestre

Orientador
Prof. Dr.-Eng. José Cal-Vidal

LAVRAS-MINAS GERAIS-BRASIL
1997

**Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA**

Carneiro, Clécia da Silva.

Estruturação e morfologia de cristais de gelo sob a influência de concentrações e combinações de substâncias diversas / Clécia da Silva Carneiro. -- Lavras : UFLA, 1997.

135 p. : il.

Orientador: José Cal-Vidal.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Criopreservação. 2. Cristal de gelo - Estruturação. 3. Fruto tropical -
Danos celulares. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 664.028
- 664.0285

CLÉCIA DA SILVA CARNEIRO

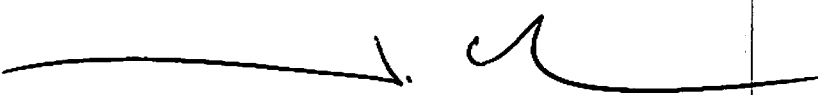
**ESTRUTURAÇÃO E MORFOLOGIA DE CRISTAIS DE
GELO SOB A INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES E
COMBINAÇÕES DE SUBSTÂNCIAS DIVERSAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos, para obten-
ção do grau de Mestre

APROVADA em 13 de Agosto de 1997


Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos


Profª. Dra. Lisete Chamma Davide


Prof. Dr. José Cal-Vidal
(Orientador)

A DEUS

Aos meus pais Raimundo e Domissia e minhas irmãs Jocicler, Cleonir e Gláucia,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade para realizar o curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu Orientador Prof. Dr. José Cal-Vidal pelas críticas e elogios nas horas certas, que me levaram a não desanimar e ao mesmo tempo dar o melhor de mim em meu trabalho. Pela seriedade e o profissionalismo ao me tratar não somente como estudante, mas como um Pesquisador na Área.

Ao Prof. Dr. José da Cruz Machado pela utilização do Microscópio Ótico de Fase, indispensável à concretização do experimento.

Aos colegas do Grupo de Microestrutura e Arquitetura Alimentar pelo apoio e incentivos.

Aos Srs. Miguel Garcia de Paula e Cipriano Porfírio da Silva pela ajuda durante o plano experimental.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 O processo de cristalização	5
2.2 Formação e crescimento de cristais de gelo	12
2.3 Fatores que afetam o tamanho, morfologia e localização dos cristais de gelo .	22
2.4 Interações gelo/soluto	37
2.5 Danos físico-mecânicos em frutos congelados	54
2.6 Tentativas de estabilização e/ou inibição de cristais de gelo	65
3 MATERIAL E MÉTODOS	74
3.1 Soluções-modelo	74
3.2 Congelamento das soluções	74
3.3 Registro microscópico	83
3.4 Análise e interpretação morfológica-estrutural	84
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1 Cristais de gelo produzidos em água pura	85
4.2 Efeito de açúcares sobre a estruturação e morfologia dos cristais de gelo	87

4.3 Influência da piridoxina (Vitamina B ₆) e creatina (ácido α -metil guanidoacético) sobre a estruturação dos cristais de gelo.	110
4.4 Estruturação do gelo na presença de aminoácidos	115
5 CONCLUSÕES	126
6 POSSÍVEIS APLICAÇÕES DECORRENTES DESTE TRABALHO	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Polimorfismo do gelo	25
2 Estruturas primárias de polipeptídeos anticongelantes sintéticos	46
3 Tempo e velocidade de congelamento para arandos e amoras silvestres	63
4 Efeito do método de congelamento sobre a perda de suco em arandos e em amoras silvestres	63
5 Efeito dos níveis de sorbitol cristalino no crescimento de cristais de gelo em surimi extrudado	67
6 Substâncias empregadas nas soluções submetidas a congelamento	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Energia livre G^* para um núcleo de gelo contendo i^* moléculas	7
2 Limites de temperatura para círculos d'água congelada (a) contendo impurezas e (b) água purificada. (Langham e Mason, 1958)	8
3 Núcleos de vários volumes com raios constantes. r^* , raio crítico; θ , ângulo de contato; N , número de moléculas d'água no núcleo. $N_1 > N_2 > N_3 > N_4$. (Chalmers, 1964).	10
4 Limites de temperatura de núcleos esféricos com raio R e parâmetro de energia superficial m . (Fletcher, 1970)	12
5 Curvas de congelamento para a água pura e para uma solução simples.	14
6 Diagrama simplificado da temperatura versus concentração para um sistema aquoso binário.	16
7 Relação entre o tamanho médio do gelo em ágar congelado e a velocidade de movimento da frente congelante (Miyawaki e Bae, 1992).	19
8 Distribuição do tamanho dos cristais de gelo. (Shirai et al., 1986)	21
9 Comparação entre a taxa de crescimento dos cristais observada e calculada. (Shirai et al., 1986).	21
10 Esquema estrutural do gelo.	23
11 Sistemas cristalinos e suas diferenças entre eixos e ângulos.	24
12 Tipos de formação de gelo observados em várias soluções aquosas congeladas a	

	diferentes velocidades. (1) Forma hexagonal, em glicerol a -35°C . (2) Dendrito irregular, em 10% de sacarose a -65°C . (3) Esferulita plana, em glicerol a -60°C . (4) Roseta irregular, em gelatina 50% a -25°C	28
13	Algumas formas de cristais de gelo livres na água.	29
14	Efeito da concentração de glicose em cristais de gelo formados logo após iniciar a cristalização. (a) Solução de glicose a 10%. (b) Solução de glicose a 20%. (Shirai et al., 1987).	32
15	Estrutura do gelo formado em espessa coalhada de proteína de soja congelada a -5°C na seção paralela (A) e perpendicular à direção do fluxo térmico (B).	34
16	Efeito da velocidade de movimento da frente congelante no tamanho médio do cristal de gelo formado em espessa coalhada de proteína de soja.	35
17	Efeito da velocidade de movimento da frente congelante no tamanho médio do cristal de gelo formado em grande fatia de coalhada de proteína de soja.	35
18	Efeito da velocidade de movimento da frente congelante no tamanho médio do cristal de gelo formado em espessa coalhada de proteína de soja congelada por ultrason (O). Congelada com adição de Agl (●) e CaCO_3 (Δ), e em espesso gel de albumina (▲).	35
19	(A) cristais de gelo formados em água destilada, plano basal paralelo ao eixo da página. (B) cristal de gelo formado em extrato de centeio de inverno não aclimatado ao frio, sem crescimento visível ao longo do eixo c (visto normal ao plano da página). (C - F) sequência de crescimento de cristais de gelo a medida que foi-se reduzindo a temperatura em extrato de centeio de inverno aclimatado ao frio, faces prismáticas hexagonais ao longo do eixo c (vista paralela ao eixo da página). (G) coluna de gelo hexagonal orientada ao longo do eixo c (vista normal ao eixo da página).	41
20	Morfologia de cristais de gelo em concentrados de proteínas anticongelantes parcialmente purificados de folhas de centeio de inverno aclimatados ao frio. (A) orientação dos cristais de gelo. (B-D) sequência de crescimento de um cristal de gelo a medida que a temperatura foi reduzida. (B) bipirâmide incompleta. (C) bipirâmide. (D) forma de agulha.	42
21	Microfotografias do crescimento de cristais de gelo em soluções contendo proteínas e peptídeos. (A) Soroalbumina bovina (10mg/ml). (B) e (C) Asp-Arg (0,26mM).	45
22	Scyllo-inositol inserido em camadas da grade cristalina do gelo.	47
23	β -1,3-poliglucano na grade cristalina do gelo.	48

24	Desenho esquemático do ácido hialurônico na grade cristalina do gelo. M, metal monovalente. ---, ligações com o gelo na camada adjacente.	49
25	Ácido hialurônico na grade cristalina do gelo. Desenho do modelo espacial de Dreiding.	49
26	Microfotografias de cristais de gelo formados em água pura (a) e em 5% de solução de Dextrana T500 (b) a uma magnificação de 20x. $\Delta T^\circ = 055$ (Shirai et al., 1985)	50
27	Cristais de gelo formados em água pura (a) e solução contendo 1,5% de sulfato de dextrana (b). (Shirai et al., 1985).	52
28	Detalhe da frente congelante.	53
29	Congelamento rápido de soluções com 0,2% de polissacarídeos. (a) goma xantana; (b) goma locusta; (c) carragena e (d) goma guar. Os cristais de gelo se apresentaram paralelo ao plano da fratura em a, inclinado b e perpendicular em c e d. Barra 25 μ m (todas as figuras têm a mesma magnificação).	69
30	Congelamento rápido de soluções com 20% de sacarose na presença de 0,2% de polissacarídeos. (a) goma xantana; (b) goma locusta; (c) goma guar. Barra = 25 μ m (todas as figuras têm a mesma magnificação).	70
31	Cristais puros de arabinose (A), xilose (B), glicose (C), piridoxina (D), creatina (E), metionina (F), arginina (G) e lisina (H)	76
32	Natureza químico-estrutural das substâncias utilizadas nas soluções-modelo que foram submetidas a congelamento. (A) arabinose, (B) xilose, (C) glicose, (D) piridoxina, (E) creatina, (F) metionina, (G) arginina, (H) lisina.	81
33	Formação de cristais de gelo em água pura. ($\Delta T=20^\circ\text{C}$).	86
34	Formação de cristais de gelo em solução aquosa contendo arabinose	89
35	Formação de cristais de gelo em solução aquosa contendo xilose.....	92
36	Formação de cristais de gelo em solução aquosa contendo glicose	95
37	Ligações da glicose com a grade do gelo. Molécula de glicose entre duas camadas d'água adjacentes (a). Conformação da superfície do gelo hexagonal ligado a moléculas de glicose (b). ---, ligações com o gelo na camada adjacente. Adaptado dos modelos para scyllo-inositol e β -1,3-poliglucano, respectivamente, concebidos por Warner (1962).	98
38	Adaptação do modelo para β -1,3-poliglucano de Warner (1962) para moléculas de	

	xilose. —, ligações com o gelo na camada adjacente.	99
39	Adaptação do modelo para β -1,3-poliglucano de Warner (1962) para moléculas de arabinose. —, ligações com o gelo na camada adjacente.	100
40	Morfologia de cristais de gelo obtida em solução aquosa composta. (arabinose, 2: xilose, 1).....	102
41	Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas compostas (arabinose, 1 : xilose, 2).	104
42	Formação de cristais de gelo em solução aquosa composta (arabinose, 2 : xilose, 2 : glicose, 1).	105
43	Estruturação de cristais de gelo em glicose 30% e solução composta, 10% (arabinose, 1 : xilose, 2).	107
44	Estruturação de cristais de gelo em solução composta, 20% (arabinose, 2 : xilose, 1) e solução de arabinose 20%	108
45	Formação do gelo em substratos de diferentes geometrias. a) substrato plano (Volmer, 1939), b) substrato esférico (Fletcher, 1958), c) substrato cônico (Mahata e Alofs, 1975), d) depressões cônicas (Wylie, 1953, Fletcher, 1969), e) depressão cônica com fundo achatado (Turnbull, 1950).	109
46	Configuração estrutural de cristais de gelo em solução aquosa de piridoxina	111
47	Modelo proposto para ligações na grade do gelo contendo baixa concentração de piridoxina (1%).	113
48	Modelo proposto para ligações na grade do gelo contendo piridoxina às concentrações de 5 e 15%.	114
49	Arranjos estruturais de cristais de gelo em solução aquosa de creatina	117
50	Arranjos estruturais de cristais de gelo em solução aquosa contendo metionina	119
51	Cristais de gelo em solução aquosa contendo arginina	121
52	Cristais de gelo em solução aquosa contendo lisina	124

RESUMO

CARNEIRO, Clécia da Silva. Estruturação e morfologia de cristais de gelo sob a influência de concentrações e combinações de substâncias diversas. Lavras: UFLA, 1997. 135p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)*.

Substâncias com natureza química diversa foram empregadas para estudar sua capacidade de estruturação de cristais de gelo. Soluções aquosas contendo tais substâncias foram submetidas a congelamento lento em ar estático e as amostras resultantes examinadas por microscopia ótica sob luz polarizada. Açúcares (arabinose, xilose e glicose) provocaram estruturações que variaram entre uma configuração hexagonal a arbórea, dentre outras. Vitaminas hidrossolúveis e compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos favoreceram a formação de arranjos circulares filamentosos por mecanismos diversos. Este estudo visa aprofundar os conhecimentos na área da criopreservação de frutos tropicais com vistas a reduzir os danos celulares provocados por cristais de gelo durante o congelamento.

* Orientador: Prof. Dr. José Cal-Vidal. Membros da banca: Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos e Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

SUMMARY

STRUCTURING AND MORPHOLOGY OF ICE CRYSTALS UNDER THE INFLUENCE OF VARIOUS SUBSTANCES WITH CHANGING CONCENTRATIONS AND COMBINATIONS

Several substances with a diverse chemical nature were selected to study the structuring capacity of ice crystals. Water solutions containing such substances were submitted to the slow freezing process with surround air. Samples were examined under an optical microscope under polarized light. Sugars (arabinose, xylose and glucose) promoted a range of structures, from hexagonal to tree-like configurations, among others. Water soluble vitamins and hydrophilic or hydrophobic compounds favored the formation needles arranged in a circular-type manner. This study intends to deepen the current knowledge on cryopreservation of tropical fruits to reduce cellular damage made by ice crystals during freezing.

1 INTRODUÇÃO

Nos países em que o congelamento de frutas e hortaliças já alcançou alto grau de desenvolvimento, um dos principais problemas ainda existente é o da modificação que ocorre na textura dos mesmos durante o processamento, decorrente da perda de exudato no momento do descongelamento.

Produtos de natureza vegetal constituem uma importante categoria alimentar em termos de consumo, contribuição nutricional, etc. Nestes as características textuométricas e microestruturais são de grande relevância. O congelamento representa para muitos alimentos o melhor meio de preservação a longo prazo pois associa os efeitos favoráveis das baixas temperaturas às transformações da água em gelo. Microrganismos não se desenvolvem a uma temperatura inferior a -10°C , portanto, o usual armazenamento dos produtos congelados a -18°C , impede quase que totalmente a atividade microbiana, além do que, a velocidade da maioria das reações químicas é notavelmente reduzida e as reações metabólicas celulares paralisam completamente. Enfim, a transição água-gelo tem a vantagem de fixar a estrutura do tecido e a água sob a forma de cristais de gelo, não estando esta portanto disponível nem como dissolvente, nem como reativo. Assim, a difusão das outras espécies químicas no tecido é muito lenta, o que contribui, ao mesmo tempo que o decréscimo da temperatura, para diminuir a velocidade da maioria das reações.

O congelamento preserva, mas também destrói. Entre os processos de preservação, o congelamento é o que mantém as características organolépticas e nutricionais mais similares às do produto fresco, porém exerce forte influência sobre a estrutura do produto causando danos à textura e microestrutura. Para otimizar a qualidade de alimentos, é essencial entender os efeitos do congelamento, condições de estocagem e descongelamento na textura e microestrutura dos mesmos. A formação de gelo corresponde à mudança da fase na qual moléculas de água cessam seu movimento e formam uma estrutura ordenada de cristais. Muitos alimentos que sofrem congelamento possuem entre 55% e 95% d'água. É esta formação de cristais de gelo a partir d'água que causa os maiores problemas em alimentos congelados.

Em geral, frutas e outros produtos vegetais apresentam o maior desafio para produtores de alimentos congelados. Estes materiais biológicos podem sofrer consequências graves durante e após o seu congelamento por causa da natureza de seus tecidos. As células vegetais consistem do citoplasma envolvido por uma membrana celular, o todo é contido dentro de uma estrutura externa mais rígida (parede celular) composta de fibras de celulose circundada por água. A estrutura celular é suportada pela pressão de turgor causada pela água contida dentro do citoplasma e pode ser afetada física e quimicamente pela formação de cristais de gelo. Estes podem perfurar as membranas permitindo a reação de enzimas e substratos, acelerando assim a quebra de células e o desenvolvimento de danos indesejáveis, incluindo mudanças físicas, organolépticas e outras.

Há dois mecanismos que podem promover o dano à estrutura celular e conduzir diretamente à diminuição da firmeza do tecido vegetal. O primeiro está relacionado com a possibilidade de perfuração da membrana celular pelo cristal de gelo intracelular, que contribui

para a redução da pressão de turgor. O segundo relaciona-se com a quebra da estrutura da parede celular pelo cristal formado no meio extracelular, abrindo caminho para o colapso celular.

Muitas conversões químicas e enzimáticas têm lugar em produtos congelados a despeito dos baixos valores de temperatura e atividade d'água (a_w). Além disso, uma contínua desnaturação de proteínas e lipoproteínas, conversão da clorofila em ácido ascórbico, hidrólises de fosfolipídeos, oxidação de lipídeos, formação de ácidos graxos livres, descoloração marrom, deterioração do aroma, etc., são observadas. Há problemas específicos associados com alguns produtos especiais como o pão (retrogradação do amido). As proteínas podem desnaturar pela alteração das estruturas terciárias ou pela ruptura até alcançar a menor unidade a qual não se reagrupa no descongelamento. Vitamina C (ácido ascórbico) pode ser convertida para ácido deidroascórbico sendo este tão ativo quanto a vitamina C, e ácido 2,3-diquetogulônico, que não é ativo. Pectinas, as quais formam um cimento mantendo as células vegetais individuais juntas, podem ser desesterificadas de modo que células podem separar-se. Isto pode ser contraposto pela adição de sais de cálcio. O cálcio forma ligações adicionais intermoleculares com a pectina e fortalece a junção entre as células.

Certas substâncias podem ser usadas como crioprotetores, reduzindo a formação de gelo via depressão da atividade d'água, prevenindo deste modo o dano às membranas, minimizando a atividade enzimática e a deterioração textuométrica. Algumas destas substâncias agem pela retirada d'água por osmose, promovendo a formação de soluções muito concentradas dentro das células. É importante notar que certos materiais dissolvidos reduzem a taxa de crescimento dos cristais de gelo consideravelmente, materiais orgânicos podem ter um maior efeito. Isto deve-se à velocidade sob a qual as moléculas podem difundir na superfície do gelo. Solutos presentes na

água também podem influenciar diretamente a morfologia dos cristais de gelo. Esses efeitos são particularmente importantes no congelamento de gêneros alimentares.

A quantidade de gelo que será formada é também de importância técnica por causa dos efeitos da capacidade de resfriamento requerida.

No intento de contribuir para a minimização de danos causados pelo congelamento este estudo tem como objetivos:

- Estabelecer a influência de substâncias diversas na estruturação e morfologia de cristais de gelo a partir de soluções-modelo.

- Estabelecer possíveis mecanismos de cristalização considerando a redução da mobilidade molecular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O processo de cristalização

A simples remoção de calor com a consequente redução da temperatura não constitui o que conhecemos como processo de congelamento. Congelamento inclui a conversão d'água líquida para o estado sólido que se conhece como gelo. Considera-se que o processo global desta mudança de fase/cristalização consiste de duas etapas: a formação de núcleos de cristalização e o crescimento dos cristais.

Em um sistema a 0°C coexistem água e gelo, assumindo a não adição de calor. Ultrapassando uma dada barreira de energia (energia de ativação), inicia-se a nucleação. Esta barreira de energia pode ser explicada com base nas mudanças de energia livre que acompanham a nucleação (Fennema, Powrie e Marth, 1973). Uma equação apropriada para este propósito é:

$$\Delta G = \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_p + 4\pi r^2 \theta \quad (1)$$

Onde,

ΔG : troca de energia livre que acompanha a formação de uma partícula esférica ordenada;

r : raio da partícula;

ΔG_P : diferença de energia livre das fases sólida e líquida durante o subresfriamento;

θ : energia livre interfacial por unidade de área

O subresfriamento é necessário para que o núcleo seja formado. Partículas do soluto e do solvente se movem em diferentes direções podendo ocorrer ocasionalmente que um grupo de moléculas de soluto chegue a unir-se por forças intermoleculares as quais podem cessar ocasionando a destruição de tais grupos. A temperaturas abaixo do ponto de congelamento, agregados ordenados de moléculas (agrupamentos) se encontram em um estado dinâmico: formação muito rápida seguida de destruição. Há um tamanho crítico do cristal no qual a chance para o agregado crescer é a mesma que este tem para redissolver-se. Acima do tamanho crítico, a chance de crescimento é maior e agregados mais estáveis são formados, estes funcionarão como núcleos de cristalização (Leniger e Beverloo, 1975). Quanto mais elevada a saturação, menos transitórios são estes grupos e alguns deles podem orientar-se com uma maior probabilidade. Tão logo estes atingem um tamanho apreciável, sua solubilidade é menor do que a dos grupos transitórios menores, favorecendo seu crescimento e absorvendo o soluto circundante que promove o crescimento dos cristais (cristalização do soluto).

Considerações termodinâmicas explicam que a temperatura para a nucleação homogênea e esta, dependem da área de uma determinada massa d'água. A água no estado sólido apresenta um menor valor de energia livre do que o correspondente à água subresfriada. A construção de um cristal com uma superfície livre é resultado da energia superficial. Para um pequeno núcleo de gelo

o raio da superfície (ao longo do eixo a) em relação ao volume é tão grande que, abaixo de um número crítico de moléculas, a energia livre é maior no núcleo do que no fluido. Isto é expresso pela eq.(2) e pela Fig.2.

$$\Delta G_i = (\mu_s - \mu_l)i + A_i^{2/3} \quad (2)$$

Onde,

ΔG_i representa a mudança em energia livre quando um núcleo de i moléculas é formado;

μ_s e μ_l são potenciais termodinâmicos para os estados sólido e líquido respectivamente;

A depende da energia superficial específica.

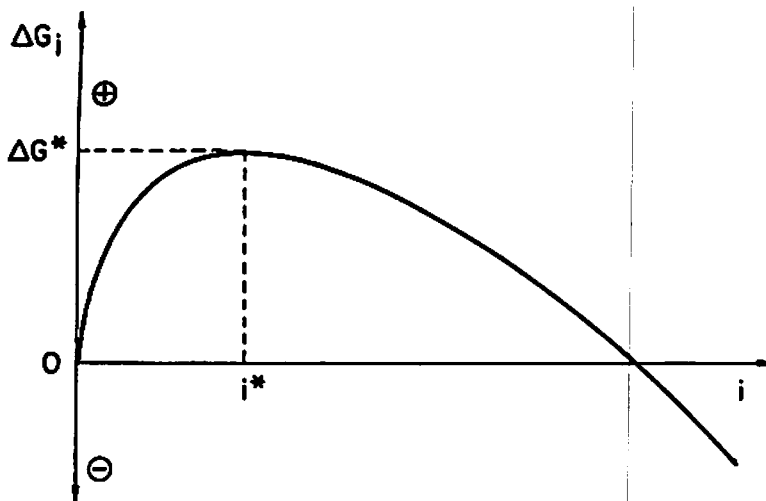


FIGURA 1. Energia livre G^* para um núcleo de gelo contendo i^* moléculas (Quervain, 1975).

Um núcleo menor do que um raio crítico i^* pode ser formado contra a barreira de energia por flutuação de energia estática, contudo, mais adiante o crescimento começando do tamanho crítico é afetado espontaneamente pelo decréscimo da energia livre. A nucleação aumenta com o aumento da área como referido pela curva da Fig.2 (Quervain, 1975).

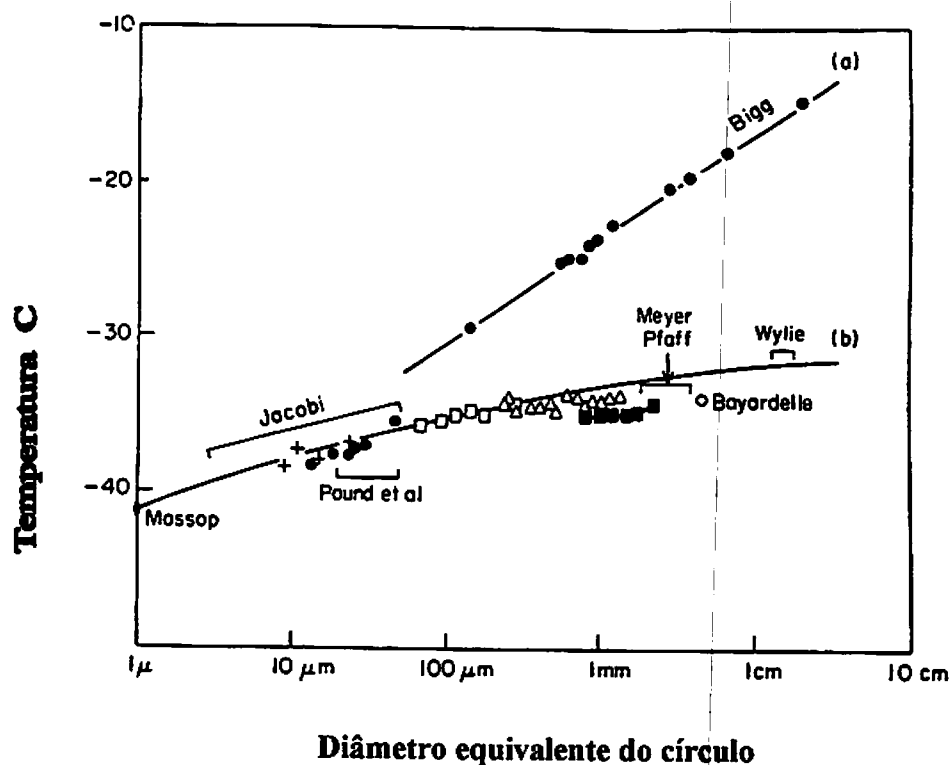


FIGURA 2. Limites de temperatura para círculos d'água congelada (a) contendo impurezas e (b) água purificada (Langham e Mason, 1958 - citados por Quervain, 1975).

Com o passar do tempo, os cristais de gelo aumentam em tamanho agregando-se e decrescendo em número, além de assumir uma morfologia mais perfeita em uma persistente tentativa para alcançar um estado de equilíbrio caracterizado pela mínima energia livre e potenciais químicos equalizados entre todas as faces. Este processo referido como crescimento,

amadurecimento ou recristalização dos núcleos é comum a todos os alimentos e aumenta na proporção em que a temperatura de estocagem subcongelada é aumentada.

A intensos subresfriamentos, o gelo pode ser nucleado espontaneamente em soluções por um mecanismo heterogêneo. A formação dos cristais de gelo pode ser catalisada pela presença de impurezas microscópicas (ex. partículas de poeira) em uma solução ou pela estrutura superficial do recipiente contendo a solução. Substâncias solúveis produzem uma depressão da temperatura de nucleação homogênea e da temperatura de fusão. Um típico exemplo de nucleação é a do iodeto de prata que é adicionado a nuvens de vapor d'água. O iodeto de prata catalisa a formação de cristais de gelo a partir do vapor construindo uma matriz na qual as moléculas de água podem formar um arranjo apropriado para a formação dos cristais de gelo. A velocidade de nucleação se eleva com a intensificação do subresfriamento. Presume-se, contudo, que com uma contínua redução de temperatura, a probabilidade de nucleação reduziria em função do aumento da viscosidade do líquido.

O subresfriamento requerido para a nucleação heterogênea depende da natureza e estrutura de impurezas presentes e das concentrações das soluções. A nucleação, contudo, pode ocorrer a subresfriamentos mais intensos em suspensões cristalizadoras por outros mecanismos. Quando os cristais que já existem na suspensão começam a entrar em contato com as paredes de um cristizador, um núcleo secundário pode ser formado. Esse contato causa atrito microscópico ou quebra da semente de cristais de modo tal que núcleos são dispersos na solução. Se as condições são apropriadas, esses fragmentos sobrevivem e crescem. Em muitos casos envolvendo o processo de crescimento em suspensão, a forma dominante de nucleação é a secundária (Hartel e Chung, 1993).

A Fig.3 apresenta quatro núcleos de raios críticos iguais e presumivelmente igual estabilidade, mas diferem no número de moléculas d'água envolvidas. A Fig.3a representa a

nucleação homogênea, uma esfera inteira pode ser formada com moléculas d'água ordenadas concluindo um núcleo de tamanho crítico. A Fig.3b, 3c e 3d representam nucleações heterogêneas em superfícies planas ou curvas, com igual ângulo de contato θ . Um decréscimo, dentro de certos limites do ângulo de contato, pode reduzir o número de moléculas envolvidas no raio crítico requerido e reduzir o grau de subresfriamento exigido para a nucleação. Por esta razão, a nucleação heterogênea envolve menos moléculas d'água e uma menor energia de ativação do que a nucleação homogênea.

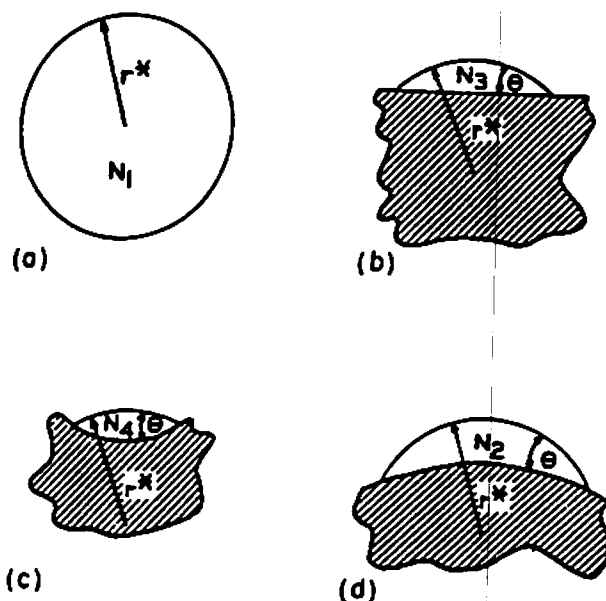


FIGURA 3. Núcleos de vários volumes com raios constantes. r^* , raio crítico; θ , ângulo de contato; N , número de moléculas d'água no núcleo. $N_1(a) > N_2(d) > N_3(b) > N_4(c)$. (Chalmers, 1964 - citado por Fennema, Powrie e Marth, 1973).

Quando moléculas ou aglomerados de água pura unem-se na fase sólida, pode ocorrer um aumento do seu volume em até 9%. Se um núcleo de gelo está presente, este processo é

iniciado e se processa suavemente abaixo de 0°C a pressão atmosférica. À temperatura de 0°C começa a temperatura de equilíbrio. Na ausência de gelo incipiente, contudo, a água pura tem que ser resfriada a temperaturas de até -39°C (temperatura de nucleação homogênea) após iniciar-se o congelamento. Ordinariamente, a água contendo substâncias estranhas congela a uma temperatura na faixa de -6°C a -25°C. Note-se que os chamados 'núcleos de gelo' são partículas de gelo, contudo, um **núcleo congelante** ou **substâncias precursoras de gelo** têm geralmente natureza diversa.

Teorias simplificadas definem a atividade de um precursor insolúvel de gelo através de um parâmetro m envolvendo a energia superficial relativa entre a substância e o gelo (θ_{fs}), a substância e a água (θ_{fl}) e entre o gelo e a água (θ_{sl}), onde

$$m = (\theta_{fl} - \theta_{fs}) / \theta_{sl} \quad (3)$$

Os núcleos de gelo de tamanho crítico podem ser formados por partículas sólidas numa proporção que depende do seu tamanho, do parâmetro m e da temperatura. Para partículas esféricas de raio R , curvas para limites de temperatura são elaboradas (Fig.3) com m como parâmetro. Elas demonstram limites de temperatura mais elevados para partículas nucleantes maiores. O valor $m = +1$ é tomado para uma partícula de gelo. Partículas maiores do que 2 μ m em diâmetro, não necessitam de subresfriamento para seu crescimento. As outras curvas ($m < 1$) correspondem a substâncias com reduzida eficiência de nucleação e limite de temperatura baixo.

Numerosas substâncias naturais são ativas como núcleos precursores congelantes na faixa de -25° a -15°C (poeira mineral, partículas orgânicas). À temperaturas acima de -10°C poucas substâncias inorgânicas são efetivas [CuS (-7°C) e PbJ₂ (-6°C) e AgJ (-4°C)]. Surpreendentemente,

altos limites de temperatura são encontrados com certas substâncias orgânicas como a isoleucina D (-1°C), triptofano D (-2°C) e colesterol (-1°C). Sabe-se que a eficiência nucleante do CO_2 sólido (sublima a $-78,5^{\circ}\text{C}$) nas nuvens subresfriadas é baseada na formação de germens de gelo por nucleação homogênea (Quervain, 1975).

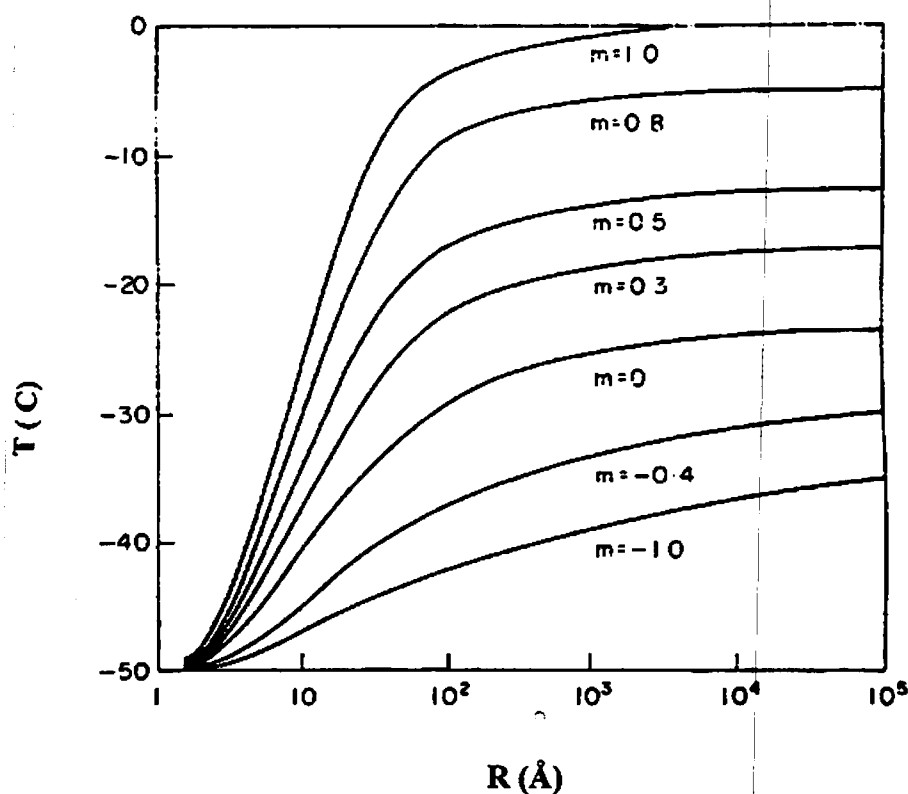


FIGURA 4. Limites de temperatura de núcleos esféricos com raio R e parâmetro de energia superficial m . (Fletcher, 1970)

2.2 Formação e crescimento de cristais de gelo

O crescimento de cristais de gelo se deve à migração das moléculas d'água para o núcleo existente, a qual ocorre a uma temperatura próxima ao ponto de congelamento. Na realidade, a

velocidade de crescimento dos cristais de gelo depende da velocidade com que o calor é eliminado (Cheftel, Cheftel e Besançon, 1982). Uma vez que um núcleo é formado, o crescimento do cristal depende do grau de suprimento de moléculas d'água na fase líquida e da remoção do calor latente livre. O suprimento de moléculas é abundante no caso da cristalização da fase líquida.

As velocidades de resfriamento e de formação do gelo são determinadas pelo gradiente de temperatura na água ou gelo. A quantidade de **transferência de calor** é fator limitante no desenvolvimento do cristal (à medida que o grau de remoção de calor é reduzido, o grau de desenvolvimento de cristais diminui). À temperaturas muito baixas, o fator limitante constitui a **transferência de massa**, porque a elevada viscosidade do meio retarda o deslocamento das moléculas d'água. Com o material alimentar a concentração do meio atua no mesmo sentido. Quando o meio atinge um estado vítreo, esta mobilidade se reduz praticamente a zero (Trgo, Koxholt e Kessler, 1997). Substâncias em solução tais como sais, álcoois, açúcares, proteínas, etc. também retardam o crescimento dos cristais de gelo.

Após serem formados os cristais de gelo, o calor latente de cristalização causa uma significativa redução na velocidade de resfriamento do sistema até que a mudança de fase esteja completa (Fig.5). O resfriamento do sistema resulta da remoção do **calor sensível** e somente este pode ser removido até o momento em que o processo de cristalização já tenha sido de algum modo iniciado, requerendo a manutenção do sistema de refrigeração para remover também o **calor latente** de cristalização. É por esta razão que o cálculo das velocidades de resfriamento em sistemas alimentares é um grande problema. Não somente os efeitos da remoção do calor sensível e latente diferem, quando considerando as mudanças de temperatura versus tempo dentro do sistema, mas também é incerto o ponto exato (no tempo e no espaço) no qual a cristalização é iniciada e, conseqüentemente, o grau de calor latente contribui para o problema de transferência de calor (Reid, 1983).

Os procedimentos de congelamento de alimentos diferem dos empregados para a água pura em vários aspectos. A primeira diferença importante é que a temperatura na qual os cristais de gelo aparecem primeiro é logo inferior a 0°C , em geral entre $-0,5$ e -1°C . Outra diferença importante é que o congelamento não é completo à temperatura da formação inicial do gelo, mas a uma temperatura inferior; em muitos casos, toda a água congelável é congelada a uma faixa de temperatura que varia entre -25 e -30°C (Spiess, 1980).

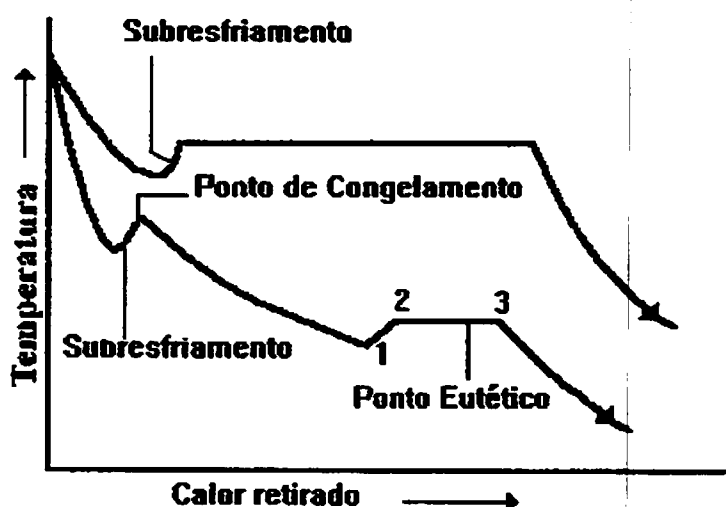


FIGURA 5. Curvas de congelamento para a água pura e para uma solução simples.

Slade e Lavine (1991) sugerem que idéias derivadas da ciência dos polímeros podem ser usadas para estudar sistemas de baixa umidade e alimentos congelados. Especificamente, eles apontam que um sistema aquoso congelado pode conter as fases vítrea ou amorfa além de uma fase cristalina, e que as propriedades físico-químicas destas podem influenciar as reações prevalentes. Em um sistema contendo gelo, a progressiva redução da temperatura abaixo do

ponto de congelamento resulta no aumento da concentração de solutos no meio não congelado gerando novas formas de gelo. Presume-se que, este líquido não congelado comporta-se como um meio viscoso e amorfo, com possibilidades de possuir certa mobilidade.

A temperatura na qual o soluto atinge a saturação é conhecida como ponto eutético, e esta temperatura é específica para cada soluto. A faixa de ponto eutético para lactose é de cerca de -4°C e abaixo de -86°C para HCl. Comumente em alimentos os solutos têm temperaturas eutéticas que variam dentro desta faixa.

O resfriamento de um sistema binário a uma temperatura abaixo da temperatura eutética do soluto pode resultar em duas possibilidades: 1) uma mistura eutética pode formar-se de acordo com as condições de equilíbrio sólido-líquido, ou 2) o soluto pode persistir em um estado metaestável de supersaturação em violando o estado termodinâmico do equilíbrio sólido-líquido. Metaestável significa que o sistema está em um estado de energia mais elevado do que o correspondente ao estado de equilíbrio e que a conversão espontânea para uma energia inferior é improvável. Comumente a temperatura eutética está bem abaixo do ponto de congelamento inicial da amostra, e quando este é atingido, uma fase não congelada seria muito viscosa porque esta é rica em solutos e baixa em temperatura. Esta alta viscosidade impede os movimentos moleculares necessários para a nucleação do soluto, o soluto permanece em um estado metaestável de supersaturação.

Segundo Fennema (1991), se amostras diferindo somente no conteúdo de água são resfriadas na região acima do ponto de congelamento e curvas de solubilidade (Fig.6), linhas verticais imaginárias descrevendo a composição da amostra (linhas paralelas a AB) interceptariam eventualmente a do ponto de congelamento (amostras inicialmente ricas em água) ou a curva de solubilidade (amostras inicialmente ricas em soluto). Uma vez interceptadas cada uma dessas curvas, assumindo que o gelo ou soluto cristalize aproximadamente de acordo com as condições

de equilíbrio, a composição da porção não cristalizada de todas as amostras seguiria as curvas do ponto de congelamento ou curva de solubilidade e chegaria ao ponto eutético (T_e). Neste ponto, as porções não cristalizadas de todas as amostras sem considerar o conteúdo inicial de água, seria idêntico. A relação entre a temperatura de transição vítrea (T_g) e o conteúdo d'água refere-se ao conteúdo de água da fase não congelada (não à amostra inicial). A temperatura vítrea é aquela na qual a fase não congelada passa de um estado amorfo para um estado vítreo. A mudança no conteúdo de água da fase não congelada em uma amostra contendo um ganho de soluto, conduz mais facilmente à cristalização de modo a desviar substancialmente das condições de equilíbrio sólido-líquido (cristalização muito rápida).

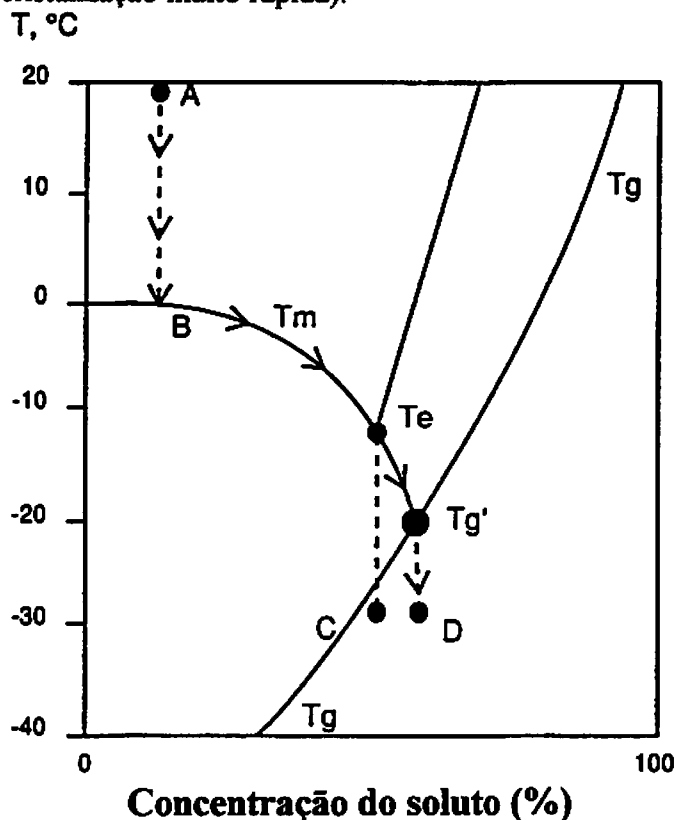


FIGURA 6. Diagrama simplificado da temperatura versus concentração para um sistema aquoso binário (Fennema, 1991).

Roos e Karel (1991) apontam que a formação do gelo em soluções de carboidratos é afetada por vários fatores incluindo o conteúdo inicial de água na solução, temperatura e tempo. Durante a formação do gelo, dá-se o aumento da concentração na solução e o aumento do valor da T_g da matriz não congelada, com decréscimo da velocidade de formação do gelo. A formação do gelo cessa abaixo da T_g .

A devitrificação é uma transição resultante de uma liberação de calor durante a formação do gelo. Uma vez que a devitrificação leva a uma adicional formação do gelo, presume-se que a velocidade de formação deste pode decrescer durante a devitrificação devido ao aumento da T_g que novamente aumenta a viscosidade e atrasa a difusão das moléculas. Também demonstrou que a temperagem isotérmica abaixo da T_g pode ser usada para formar gelo em soluções de carboidratos e foi proposto que a velocidade de formação do gelo é determinada por $T - T_g$ e portanto pela viscosidade. A fusão do gelo em soluções concentradas ao máximo pelo congelamento, inicia-se a uma temperatura específica para cada açúcar. A transição vítrea desta matriz (T_g') e a temperatura inicial de fusão do gelo nesta matriz (T_m') são independentes da concentração inicial da solução. Tem sido observado que soluções com altas concentrações iniciais de sacarose (60 a 80%) podem requerer vários dias ou semanas de temperagem até $T_g' < T < T_m'$ para atingir-se uma máxima concentração. Acima da temperatura de fusão do gelo (T_m'), a cristalização de açúcares também pode ocorrer assim como o aumento da quantidade de água não congelada e o decréscimo da viscosidade. Exemplo típico é a cristalização de lactose em sorvetes, mas a cristalização de outros açúcares pode proceder de forma substancialmente bem mais rápida.

Pesquisadores assumem que abaixo de um certo peso molecular do carboidrato, os valores de T_g' e T_m' são os mesmos. Isto pode causar uma alta proporção de água não congelada na solução com, por exemplo amido, já que o máximo estado de concentração não está formado. Polissacarídeos também retardam a formação do gelo por redução da viscosidade (Roos e Karel, 1991). A concentração por congelamento ocorre quando a maior parte da água original é retirada localmente na forma de cristais de gelo de alta pureza, forçando assim os constituintes presentes na pequena quantidade d'água a permanecerem no meio descongelado. Esta concentração pode alterar significativamente algumas propriedades físico-químicas (pH, força iônica, ponto de congelamento, pressão osmótica e potencial de óxido-redução).

O tamanho dos cristais de gelo é um crítico atributo que governa a textura em sorvetes e em outras sobremesas congeladas. Os cristais de gelo maiores do que de 40 a 55 μm podem ser detectados pela língua e como estes tornam-se maiores em sorvetes podem tornar-se ásperos com uma textura arenosa quando presentes em número suficiente. Grandes cristais de gelo podem resultar de choque térmico durante a estocagem congelada e da venda do produto ou do seu processamento sem condições operacionais ótimas (Donhowe, Hartel e Bradley Jr., 1991). Para assegurar a existência de cristais pequenos, cuidados devem ser tomados durante o congelamento, estocagem e distribuição. Velocidades muito elevadas de resfriamento providas por um SSF (scaped surface freezer) promovem a nucleação e a formação de pequenos cristais ao início do congelamento. Contudo, cuidadoso controle das condições operantes é requerido para otimizar a qualidade (Russell, 1997).

Miyawaki e Bae (1994), estimaram que a estrutura e o tamanho médio do cristal de gelo (dp) é inversamente proporcional à velocidade de movimento da frente congelante (u) como descrito pela seguinte equação:

$$ud_p/D_w \sim 1 \quad (4)$$

Onde

D_w : representa o coeficiente de difusão aparente da água.

A relação entre d_p e u mostrada na Fig.7 concordou bem com a expectativa da Eq.4.

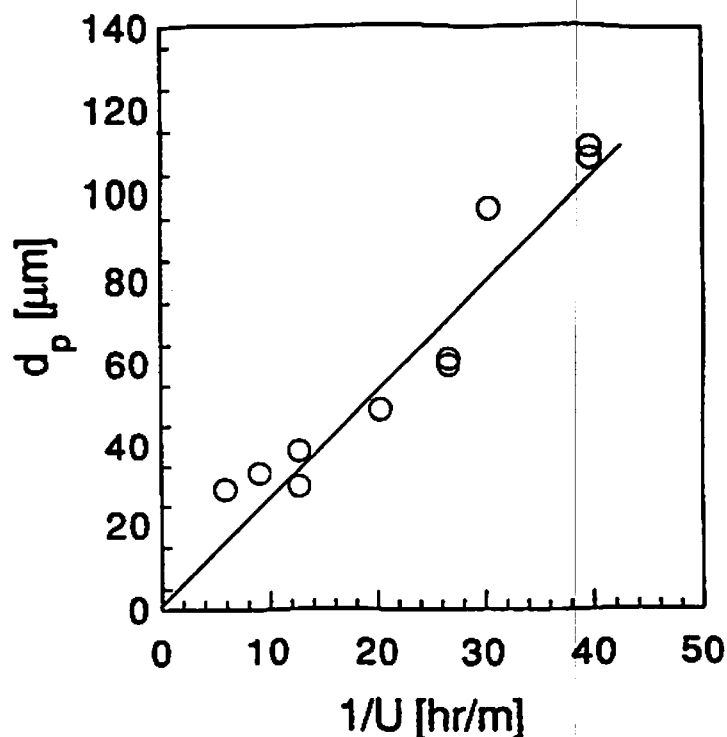


FIGURA 7. Relação entre o tamanho médio do gelo em ágar congelado e a velocidade de movimento da frente congelante (Miyawaki e Bae, 1994).

Quando tem lugar o congelamento a uma velocidade de movimento da frente congelante u , a quantidade correspondente de gelo pode ser formada na interface, com uma estrutura que não é necessariamente a de um disco plano, mas a de uma complexa estrutura dendrítica com uma espessura finita. A proporção total da formação do gelo na interface resulta do produto da velocidade de transferência de massa de moléculas d'água (K) e o fator de aspereza superficial na interface ($s = \text{área superficial real}/\text{área superficial aparente}$). A aspereza superficial é o índice

da estrutura dendrítica na interface. Destas considerações teóricas, a seguinte equação pode ser obtida:

$$u = Ks \quad (5)$$

Quando as equações (4) e (5) são comparadas, a estrutura do gelo após o congelamento está relacionada com a aspereza superficial da interface gelo-líquido. A estrutura e tamanho do gelo decresce com o aumento da aspereza superficial.

A estrutura do gelo foi estimada ser fortemente dependente da velocidade e direção da frente congelante.

Shirai et al. (1986), utilizaram um modelo para prever o tamanho e distribuição de cristais de gelo em um cristalizador tipo MSMPR (continuous mixed-suspension mixed-product removal). A equação do balanço com respeito ao tamanho do cristal foi resolvida sob condições fixas, com a dependência do tamanho e velocidade de crescimento do cristal, que é:

$$G = g_{-1} / r + g_0 \quad (6)$$

Onde,

G = taxa de crescimento linear dos cristais de gelo;

g_0 e g_{-1} = parâmetros cinéticos;

r = raio do cristal.

Um exemplo da medida do tamanho e distribuição do cristal é mostrado na Fig.8. A relação entre a elevação (ao longo do eixo c) e o diâmetro dos cristais (ao longo do eixo a) assume-se constante e o valor de 0,13, determinado em trabalhos prévios, foi adotado como raio. Então a velocidade de crescimento no eixo c pode ser determinada pela velocidade de crescimento do eixo a. A velocidade de crescimento do cristal no eixo a foi calculada por substituição dos parâmetros obtidos, g_0 e g_{-1} , na equação (6) (Fig.9).

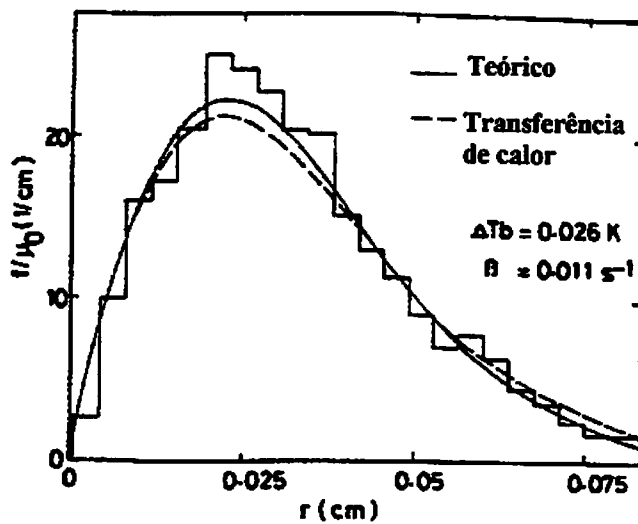


FIGURA 8. Distribuição do tamanho dos cristais de gelo. (Shirai et al., 1986)

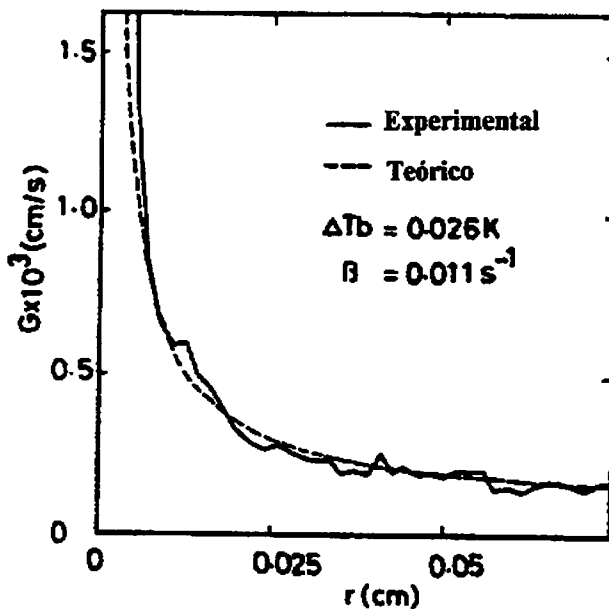


FIGURA 9. Comparação entre a taxa de crescimento dos cristais observada e calculada. (Shirai et al., 1986)

2.3 Fatores que afetam o tamanho, morfologia e localização dos cristais de gelo

Uma grande força atrativa intermolecular da água pode ser explicada adequadamente a partir de sua habilidade para engajar suas múltiplas pontes de hidrogênio em uma base tridimensional. Comparadas com as ligações covalentes (energia de ligação em torno de 335KJ/mol) as pontes de hidrogênio são fracas (energia variando de 2 a 40KJ/mol) e têm um comprimento maior e variável (Fennema, 1982). A água, com suas forças moleculares direcionadas tetraedricamente, cristaliza em uma estrutura aberta (baixa densidade) elucidada por estudos envolvendo raios-X, neutrons, difração de elétrons, infravermelho e espectroscópio de Raman (Lehninger, 1970). O cristal de gelo nunca é perfeito e os defeitos encontrados são usualmente do tipo orientacional, causado pelo deslocamento de prótons com uma formação acompanhada da orientação neutralizante, ou iônico, causado pelo deslocamento de prótons com uma formação de H_3O^+ ou OH^- (Fennema, 1982).

Os átomos em um sólido cristalino são agrupados em um repetitivo arranjo tridimensional chamado **grade cristalina** e a posição de algum ponto na grade é determinada relativa a um grupo de eixos do cristal. A grade e o sistema de eixos são ficções matemáticas usadas para descrever a atual posição atômica no espaço. Isto facilita a descrição de muitas propriedades cristalinas. A descrição da estrutura do cristal requer que a posição de todos os átomos seja estabelecida relativamente na grade.

A estrutura do gelo mais comum, I_h , conhecida há mais de 60 anos, corresponde à estrutura hexagonal de ZnS onde as posições de Zn e S são ocupadas por O. Cada íon de oxigênio é tetraedricamente rodeado por quatro íons oxigênio idênticos formando uma grade holoédrica hexagonal de simetria D_{6h} . Grandes dificuldades foram encontradas para estabelecer as posições dos prótons. Já que os elétrons estão agrupados próximos às posições do oxigênio, os prótons não

podem ser identificados por análises de raio X. Cálculos das ligações de hidrogênio, dispersão de neutrons no gelo D_2O e outros métodos, têm permitido que os prótons sejam localizados a uma distância de $0.1\text{\AA}$ dos oxigênio centrais (Quervain, 1975). A representação do gelo (Fig.10) tem certas anomalias que explicam alguns dos comportamentos deste. Ocasionalmente três prótons juntam-se em torno do oxigênio formando um íon $(OH_3)^+$. Similarmente íons $(OH)^-$ podem ser formados. Outro tipo de defeito é a dupla ocupação dos espaços O-O com prótons (D-defeitos) ou espaços vazios (L-defeitos). Esses defeitos migram em um campo elétrico e contribuem para a remarcável condutividade estática do gelo. Mais restrito à cristalização e ao crescimento do cristal do que os defeitos dos prótons, são os deslocamentos na grade de gelo. Se estes se estendem na superfície do cristal, permitem contínuas etapas de crescimento (Quervain, 1975).

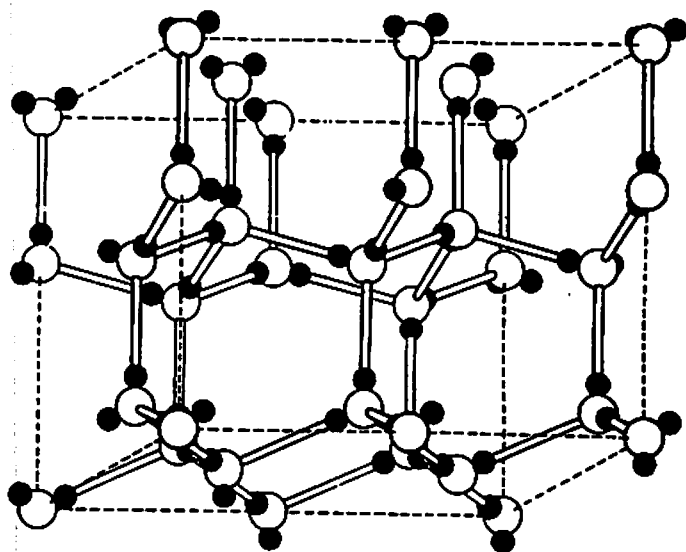


FIGURA 10: Esquema estrutural do gelo (Quervain, 1975).

Convencionou-se descrever a estrutura de cristais usando (Fig.11) oito tipos de sistemas cristalinos (monoclínico, triclinico, ortorrômico, cúbico, trigonal, tetragonal, romboedral e hexagonal). (Encyclopaedia Britannica, 1976). A tabela 1, dá uma visão geral das diferentes estruturas polimorfas da água cristalina.

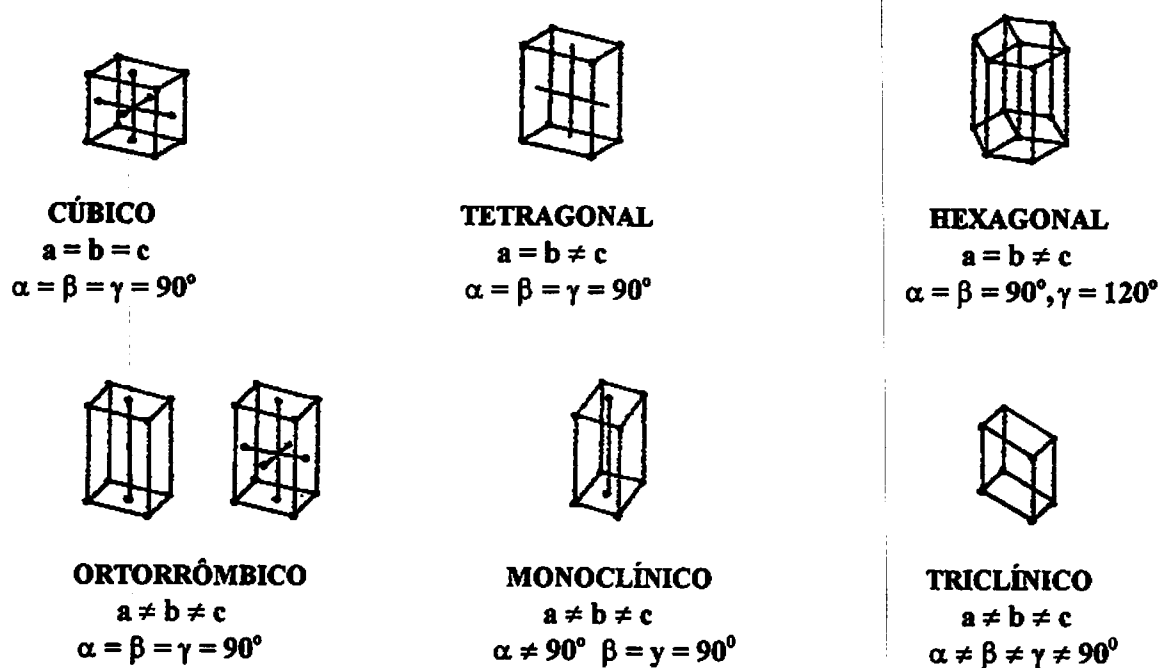


FIGURA 11. Sistemas Cristalinos e suas diferenças entre eixos e ângulos (Barrow, 1972).

TABELA 1. Polimorfismo do gelo.

Tipo	Densidade (g cm ⁻³)	Sistema cristalino	Unidade celular (Å)		Número por célula	Ordenação de prótons
			a	c		
I _h	0.92	hexagonal	4.48	7.37	4	desordenada
I _c	0.92	cúbico	6.35	-	8	desordenada
II	1.17	romboédrico	7.78	$\alpha 113.1^\circ$	12	ordenada
III	1.14	tetragonal	6.79	6.79	12	desordenada
IV	1.28	--	-	-	--	desordenada
V	1.23	monoclínico	9.22	10.35	28	desordenada
VI	1.31	tetragonal	6.27	5.79	10	desordenada
VII	1.50	cúbico	3.41	-	2	desordenada
VIII	1.50	cúbico	3.41	-	2	ordenada
IX	1.14	tetragonal	6.79	6.79	12	ordenada

O polimorfismo cúbico I_c é formado muito abaixo de -100°C e é gradualmente transformado em gelo I_h entre -100° e -80°C. Abaixo de -160°C, uma espécie de gelo vítreo condensa da fase vapor cristalizando em gelo I_c se aquecido. (Kamb, Prakash e Knobler, 1967 - citados por Quervain, 1975).

A dimensão dos cristais de gelo ao final do congelamento depende do número de núcleos cristalinos formados inicialmente. Grandes cristais são formados quando há somente poucos núcleos, enquanto muitos núcleos dão lugar a pequenos cristais. Portanto, regulando a nucleação por meio da temperatura podem-se obter cristais de tamanho desejado: a baixa temperatura a nucleação é rápida e numerosos nucléolos dão origem a uma multidão de cristais de pequeno tamanho; ao contrário, a uma temperatura próxima ao ponto de fusão, a nucleação é lenta, os núcleos cristalinos são poucos, resultando em cristais relativamente grandes. Junto a altas taxas de congelamento (e resfriamento), a taxa de propagação dos cristais de gelo iniciais é insuficiente para acompanhar os passos da taxa de retirada de calor, e um aumento no subresfriamento ocorre. Acompanhando este subresfriamento tem-se um aumento na frequência de nucleação, ex., mais núcleos tornam-se ativos - para nucleação homogênea, a taxa de nucleação J é dependente da temperatura na forma $J \propto \Delta T^2 T^3$ (Rasmussen e Loper, 1976), aqui ΔT é o subresfriamento e T é

a temperatura absoluta. O resultado é um aumento no número de cristais de gelo formados. Durante o congelamento lento, menos núcleos estão ativos e maiores cristais de gelo são formados (Reid, 1983).

A localização do gelo é muito importante. Tem sido mostrado ao longo dos anos que o congelamento lento dá lugar a grandes cristais que são formados fora das células de tecidos vegetais ou animais. O congelamento rápido, ao contrário, dá lugar a cristais de gelo que são formados fora e dentro dos tecidos celulares. Durante o congelamento lento, há migração da água das células para os cristais de gelo extracelulares, as células retraem-se e murcham devido a dessecação. A explanação para este fenômeno reside no fato de ter-se uma solução formada extracelularmente que é hipertônica comparada com o fluido dentro da célula. Durante o congelamento rápido há insuficiente tempo para a migração do fluido e assim muitos cristais também são formados dentro das células. Estas, neste caso, não retraem ou secam.

Observada ao microscópio por Cheftel, Cheftel e Besançon (1982), a forma dos cristais de gelo (esferulitas, rosetas, dendritos, plaquetas ou estrelas hexagonais,...) depende da velocidade de crescimento dos cristais (um congelamento rápido produz cristais mais ou menos arredondados, um congelamento lento cristais alargados, em forma de agulhas) e da temperatura de congelamento. A uma mesma temperatura de congelamento, a cristalização resultante é muito diferente de um tecido para o outro; essas diferenças se devem, em parte, às variações do grau de motilidade d'água nos diversos tecidos; as barreiras celulares retardam o crescimento dos cristais de gelo. O gelo pode existir em nove estruturas cristalinas polimórficas e também em um estado vítreo ou amorfo de estrutura incerta. Contudo, das 11 estruturas conhecidas, somente o gelo ordinariamente hexagonal é estável sob pressão normal a 0°C. A quantidade e classe de solutos

presentes podem influenciar a quantidade, o tamanho, estrutura, localização e orientação dos cristais (Fennema., 1982).

Luyet e Coworkers, citados por Fennema (1982), estudaram a natureza dos cristais de gelo formados na presença de vários solutos, incluindo sacarose, glicerol, gelatina, albumina, miosina e polivinilpirrolidina. Foram observados, para estruturas maiores de gelo, formas hexagonais, dendritos irregulares, esferulitas ásperas e esferulitas lábeis. Na Fig.12 as quatro estruturas são arranjadas em ordem aproximada de aparência com a velocidade de remoção de calor e concentração de soluto inicial crescente. A quarta estrutura, rosetas irregulares, foram observadas somente em suspensões altamente concentradas de gelatina ou polivinilpirrolidone. Rosetas irregulares são observadas como um tipo subdesenvolvido de dendritos irregulares. O subdesenvolvimento é presumivelmente resultante do alto peso molecular das substâncias que interferem com o processo de cristalização. Cristais hexagonais não foram observados em espécimes contendo grandes quantidades de gelatina. As estruturas de gelo observadas em gelatina possuem maior desordem do que a forma hexagonal.

Fennema, Powrie e Marth (1973) citam os estudos de Dowell et al. (1962) utilizando soluções congeladas de gelatina onde encontraram que o gelo cúbico e vítreo prevalecem com o aumento das taxas de congelamento ou o aumento de concentração da gelatina. Aparentemente a gelatina, uma grande e complexa molécula hidrofílica é capaz de restringir enormemente o movimento das moléculas d'água e sua habilidade para formar cristais hexagonais fortemente ordenados. O hábito de crescimento do cristal começa governado por anisotropia das velocidades de crescimento em diferentes direções cristalográficas. Se uma molécula de água se junta a uma face prismática, resulta em um maior ganho em energia livre do que se esta ocupasse uma posição na face basal. Contudo, o crescimento radial, como perpendicular ao eixo c, é preferido. A temperatura e a taxa de subresfriamento influencia este mecanismo e rege o hábito do cristal.

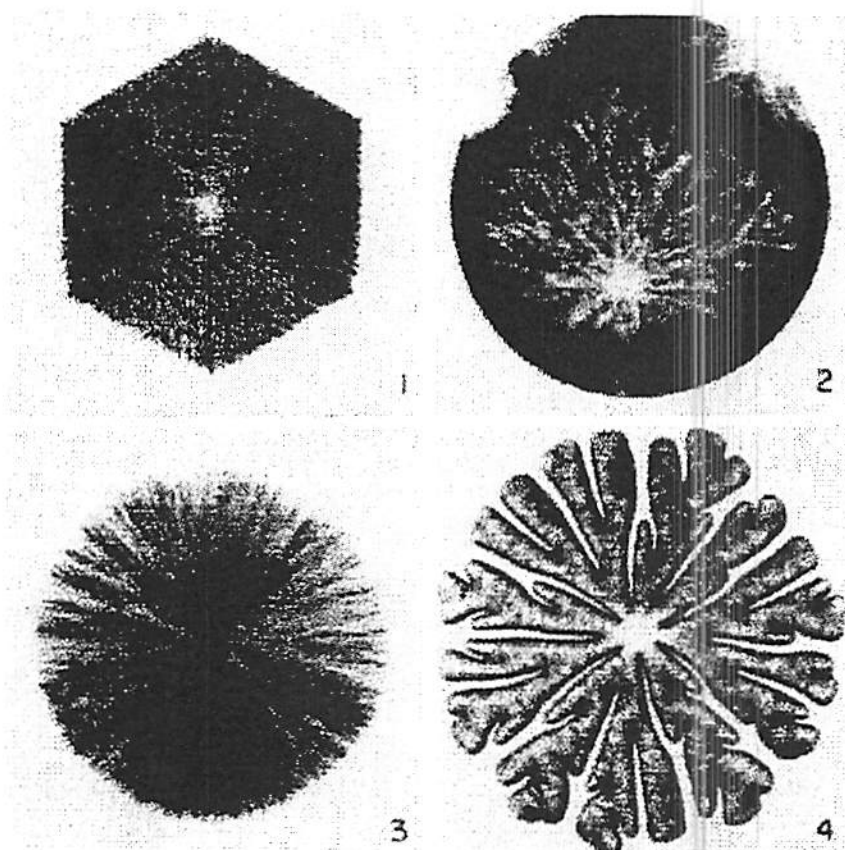


FIGURA 12. Tipos de formação de gelo observados em várias soluções aquosas congeladas a diferentes velocidades. (1) Forma hexagonal, em glicerol a -35°C . (2) Dendrito irregular, em 10% de sacarose a -65°C . (3) Esferulita plana, em glicerol a -60°C . (4) Roseta irregular, em gelatina 50% a -25°C . (Fennema, Powrie e Marth, 1973).

Para núcleos de gelo submicroscópicos, discos planos são formados. A um subresfriamento lento ($0,08$ a $0,24^{\circ}\text{C}$) a forma arredondada é preservada, com um maior subresfriamento, o crescimento na direção do eixo a torna-se dominante e uma aparência hexagonal é observada. Um subresfriamento mais elevado produz aumento na troca de calor e protudentes ângulos e ramos dendríticos aparecem (Fig.13).

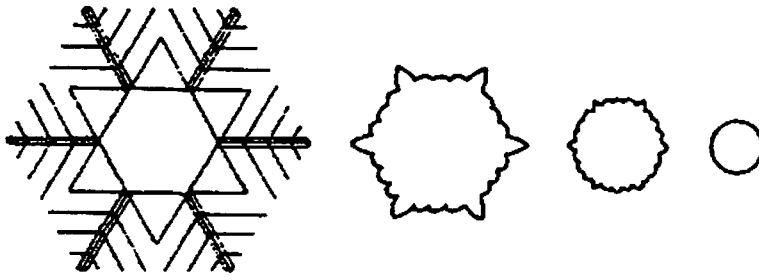


FIGURA 13. Algumas formas de cristais de gelo livres na água (Quervain, 1975).

Vários dendritos podem crescer de um núcleo a elevado subresfriamento. A velocidade linear de crescimento na direção do eixo a como uma função da supersaturação Δt é encontrada (Quervain, 1975).

$$V = A(\Delta T)^m \quad \text{para } \Delta T \leq 9^\circ\text{C} \quad (7)$$

$$= B(\Delta T) \quad \text{para } \Delta T > 9^\circ\text{C} \quad (8)$$

Com A na faixa de 0,01 a 0,2 e m de 1,3 a 2,2. Na direção do eixo c a velocidade de crescimento para baixa saturação é cerca de 100 vezes menor. O espaçamento dos ramos secundários paralelos decresce com o aumento da supersaturação de acordo com $d \approx 10^{-2}/\Delta T$ cm.

O crescimento do gelo policristalino depende primeiramente do número de núcleos ativados e estes do subresfriamento. Com velocidades de resfriamento extremamente altas e a temperaturas muito baixas, os cristais acomodam-se de modo irregular em sua grade e são submetidos a 'stress' local. Estes possíveis defeitos são o centro de uma subsequente recristalização, caracterizada por um crescimento seletivo. Na formação de gelo policristalino um

processo de formação seletiva é observado baseado na velocidade de um crescimento anisotrópico. Cristais com eixo c orientado paralelamente à interface de crescimento têm melhores chances de se formarem. Estes invadem as proximidades com orientação menos favorável. Na direção do deslocamento da interface poucos e grandes cristais são encontrados exibindo um aumento na orientação preferida. Lagos e mares gelados são os melhores exemplos deste fenômeno.

Geralmente, a velocidade de crescimento dos cristais de gelo é governada pelo transporte de massa e calor e as maiores taxas de crescimento são obtidas quando intenso subresfriamento é utilizado. Contudo, intenso subresfriamento produz finos cristais de gelo devido à nucleação secundária e resulta em uma morfologia dendrítica e irregular. Isto gera uma grande área de superfície específica para os cristais de gelo e é responsável pela perda de solutos entranhados no gelo. Comumente, este soluto entranhado tem sua concentração elevada com o progresso do congelamento por causa do aumento na viscosidade do concentrado e/ou o aumento no número de finos cristais de gelo devida à nucleação secundária. Quando se aplica o processo HPT (High Pressure Treatment) -fusão parcial sob condição pressurizada- durante o congelamento, contudo, a proporção de massa do concentrado adsorvido na superfície do gelo para a massa de gelo é quase imutável. Isto sugere que a área específica dos cristais de gelo decresce com o progresso do congelamento. A massa do concentrado adsorvido no gelo sob as mesmas condições de processo aumenta com a viscosidade do concentrado, embora os valores não sejam diretamente proporcionais à viscosidade. A partir de resultados experimentais foi concluído que a fusão parcial dos cristais de gelo por HPT durante o congelamento é útil na redução da área específica dos cristais de gelo e, conseqüentemente, a quantidade total de sólidos adsorvidos nestes (Suzuki, e Hagura, 1997).

Segundo observações de Shirai et al. (1987) sobre o crescimento dos cristais de gelo em um cristalizador, os cristais formados a uma temperatura inicial de subresfriamento (ΔT_b°) de $0,51^\circ\text{C}$ apresentaram-se muito menores do que aqueles com uma ΔT_b° de $0,152^\circ\text{C}$. Os pequenos cristais são formados somente pelo crescimento de finos cristais iniciais, sem aglomeração. O tamanho e distribuição do cristal inicial afetam o mecanismo de crescimento. O mecanismo de aglomeração envolve cristais iniciais maiores. Os autores observaram também o efeito da concentração e classes de açúcares no mecanismo de crescimento dos cristais de gelo notando que, grandes cristais foram formados em solução de 15% de lactose e em 5%, 7,5% e 10 de soluções de glicose após 2 horas do início da cristalização com uma ΔT_b° de $0,15^\circ\text{C}$. Os cristais de gelo formados em 10% de leite desnatado também foram grandes sob as mesmas condições. Contudo, os cristais de gelo não aglomeraram em soluções de 15% de glicose, permanecendo pequenos.

A velocidade de crescimento do gelo decresce com o aumento em concentração das soluções por causa da redução do grau de difusão do soluto, mas a velocidade de nucleação aumenta consideravelmente. Isto produz pequenos cristais iniciais nas soluções com altas concentrações. A Fig.14, compara os cristais de gelo formados logo após o início da cristalização em soluções de glicose a 10% e 20%. Os cristais formados em 20% de glicose apresentaram-se muito menores do que aqueles em solução de 10% de glicose e quase do mesmo tamanho daqueles em solução de 10% de lactose com ΔT_b° de $0,51^\circ\text{C}$. Os cristais de gelo formados em solução de 15% de glicose não propiciaram grandes aglomerados porque não foram formados grandes cristais no início da cristalização.

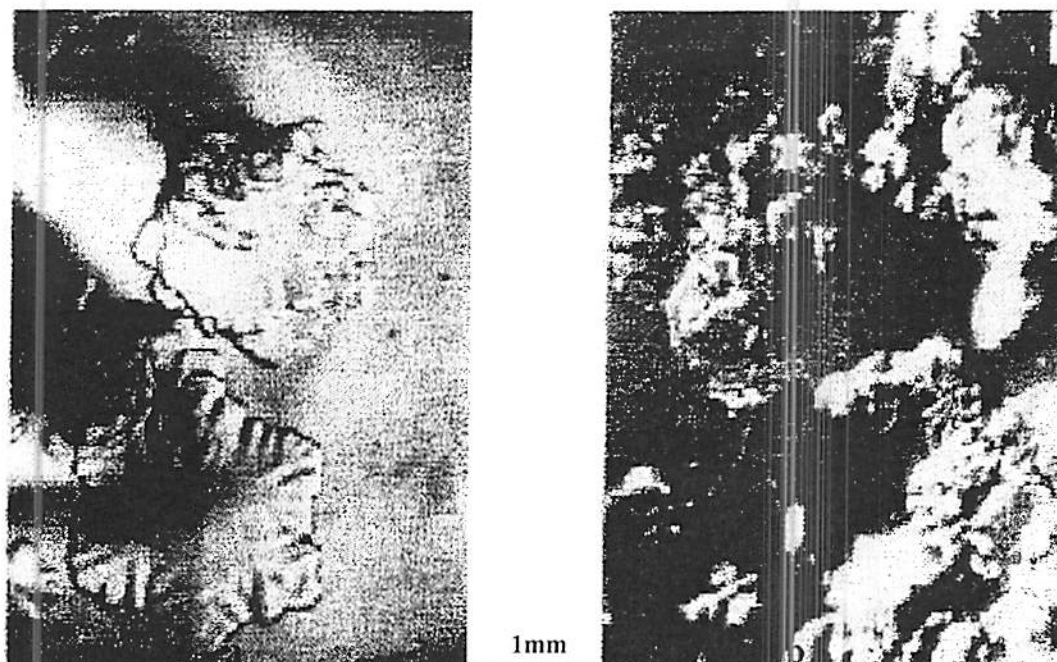


FIGURA 14. Efeito da concentração de glicose em cristais de gelo formados logo após iniciar a cristalização. (a) Solução de glicose a 10%. (b) Solução de glicose a 20%. (Shirai et al., 1987).

A concentração por congelamento ou o congelamento normal são técnicas efetivas para a concentração dos compostos (solutos) diluídos em uma solução. Bae e Miyawaki, (1994) utilizaram o método de uma frente congelante movendo-se unidirecionalmente através de uma solução e observaram que a fase sólida, deixada após a passagem da frente congelante, continha somente gelo puro, os solutos foram rejeitados por estarem concentrados. No congelamento unidirecional, cristais de gelo dendríticos crescem paralelos à direção do fluxo de calor. A equação do balanço de massa de moléculas d'água ganha a seguinte forma para a frente congelante:

Velocidade de movimento da frente congelante

= Fluxo de massa das molécula d'água por unidade de área da frente congelante

x Área da frente congelante

Pois pelo congelamento obtêm-se gelo microscopicamente puro. Esta equação explica a dependência da eficiência da concentração por congelamento na velocidade de agitação e na velocidade de movimento da frente congelante. De acordo com a equação, uma pequena área da frente congelante daria uma fina estrutura superficial tal que as moléculas de soluto são efetivamente rejeitadas da interface sólido-líquido dando uma alta eficiência de concentração por congelamento. Ao contrário, uma grande área da frente congelante com uma complexa estrutura, daria uma pobre eficiência da concentração por congelamento, através da incorporação de moléculas de soluto na fase cristalina.

Miyawaki et al. (1992), fotografaram estruturas de gelo formadas em coalhada de proteína de soja e gel da albumina do ovo congelados sob várias condições. A estrutura dendrítica foi observada crescendo em placas resfriadas, paralelamente à direção do fluxo térmico. As mudanças no tamanho e estrutura do gelo foram analisadas em diferentes localizações da placa no plano perpendicular à direção do fluxo de calor. A estrutura dos cristais de gelo, em princípio, é decidida por propriedades físicas do material a ser congelado e condições operantes do congelamento. Foi observado que estruturas de gelo cresceram nas placas resfriadas de baixo para cima com a direção do fluxo térmico e o tamanho do gelo aumentou com o aumento da distância à placa (Fig.15). Uma fina estrutura ao redor do final da placa não apresentou congelamento. Na secção perpendicular ao fluxo térmico a forma do gelo teve uma estrutura relativamente uniforme.

Em trabalho prévio, os autores propuseram um modelo teórico para descrever o tamanho médio do gelo baseado em uma amostra dimensional:

$$ud_p/D \sim \text{constante} \quad (9)$$

Onde d_p é o tamanho representativo do cristais de gelo, u é a velocidade de movimento da frente congelante e D é o coeficiente de difusão da água.

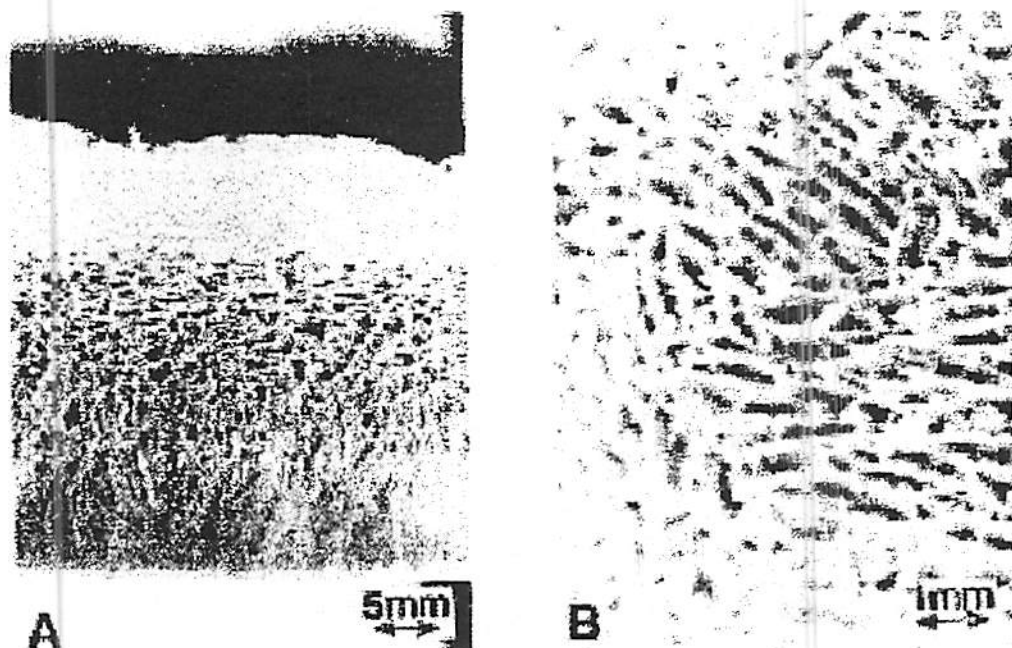


FIGURA 15. Estrutura do gelo formado em espessa coalhada de proteína de soja congelada a -5°C na seção paralela (A) e perpendicular à direção do fluxo térmico (B). (Miyawaki et al., 1992).

Para amostras congeladas a várias temperaturas, o tamanho médio do gelo (d_p) foi medido em várias posições e graficado contra o inverso da velocidade de movimento da frente congelante ($1/u$) nas Fig. 16 a 18.

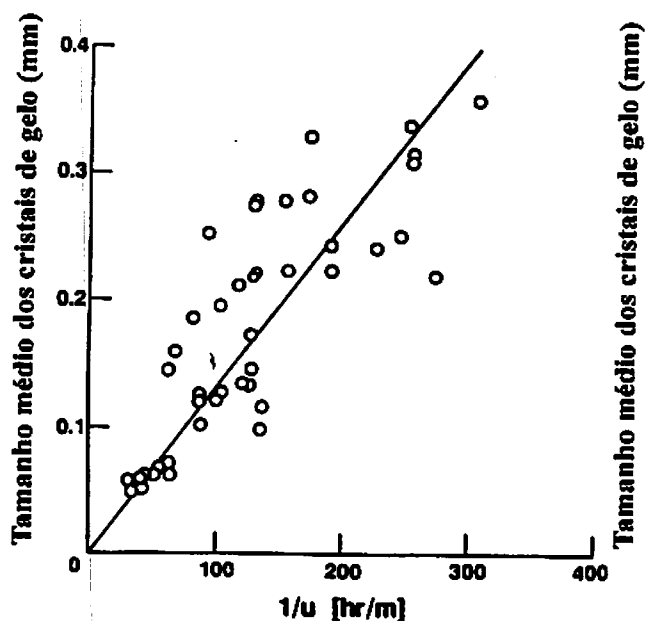


FIGURA 16. Efeito da velocidade de movimento da frente congelante no tamanho médio do cristal de gelo formado em espessa coalhada de proteína de soja

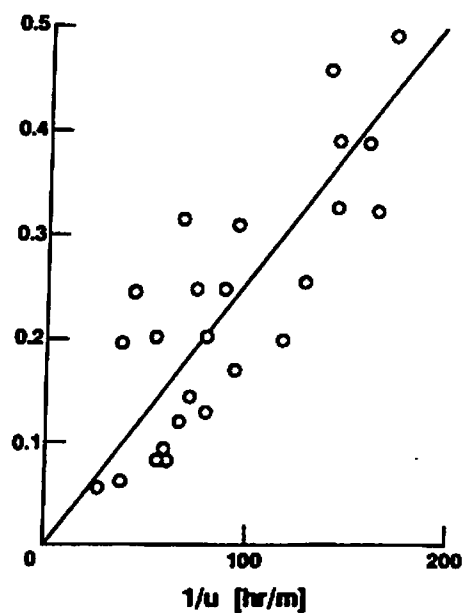


FIGURA 17. Efeito da velocidade de movimento da frente congelante no tamanho médio do cristal de gelo formado em grande fatia de coalhada de proteína de soja.

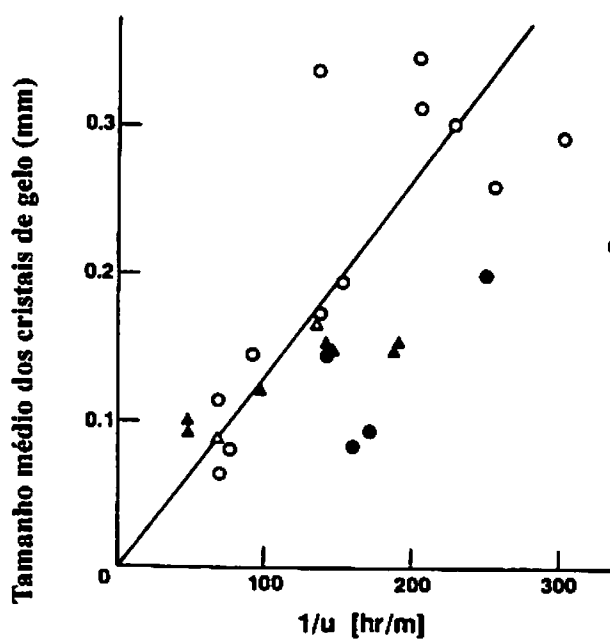


FIGURA 18. Efeito da velocidade de movimento da frente congelante no tamanho médio do cristal de gelo formado em espessa coalhada de proteína de soja congelada por ultrason (O). Congelada com adição de AgI (●) e CaCO_3 (Δ), e em espesso gel de albumina ($\blacktriangle$).

A Fig.18 mostra que a estrutura do gelo foi reduzida em cerca de 30% pela adição de iodeto de prata, mas não houve efeito substancial observado com carbonato de cálcio (efetivos nucleantes heterogêneos). (Miyawaki et al., 1992).

Os autores também propõem as seguintes equações:

$$d_p \propto u^{-2} \quad (10)$$

$$L \propto u^{-1} \quad (11)$$

Essas duas equações juntamente com a Eq.(9) elucidam o importante papel da velocidade de congelamento da frente congelante no tamanho do gelo. As equações (10) e (11) são muito diferentes na faixa de aplicabilidade. A equação 10 foi aplicada para descrever as mudanças nos cristais de gelo extracelulares com tamanho entre 30 a 50 μ m e a mudança do tamanho dos cristais de gelo, na mistura binária, de 40 a 60 μ m, enquanto a Eq.(11) foi aplicada para descrever as mudanças nos espaçamentos dendríticos para soluções aquosas entre 50 a 170 μ m. A Eq.(9) também teve uma ampla faixa de aplicabilidade na mudança do tamanho do cristal de gelo entre 50 a 500 μ m. Para a Eq.(9), ud_p mostrou ter a mesma ordem de magnitude do coeficiente de difusão da água. A regressões lineares nas Figs.16 e 17 dão as ud_p , que são $3,6 \times 10^{-6}$ e $7,0 \times 10^{-5}$ respectivamente. Esses valores não são muito diferentes do coeficiente de difusão próprio da água, $2,3 \times 10^{-5}$ cm²/seg a 25°C. Este fato mostra a importância do processo de difusão da água no crescimento do gelo dendrítico (Miyawaki et al., 1992).

2.4. Interações gelo/soluto

A água representa 60 a 95% da massa de frutos e vegetais. Muitas reações que causam mudanças na relação normal da água e os outros componentes de produtos alimentares mudariam suas características, assim como ocorre no congelamento. É sabido que todos os átomos de oxigênio na estrutura do gelo estão situados no centro de um tetraedro formado por quatro átomos de oxigênio. Quando tais tetraedros se combinam, uma estrutura hexagonal se forma (Simatos et al., 1975). Este arranjo molecular promove a formação da então chamada **grade cristalina**, com consideráveis espaços intermoleculares.

Tecidos vegetais podem ser descritos como um sistema polidisperso tendo a água como meio dispersante e na fase dispersa um grande número de substâncias orgânicas e inorgânicas, formando soluções reais (açúcares, sais, ácidos) e coloidais (proteínas, pectina), assim como emulsões (lipídeos, ceras, etc.). Soluções iônicas e moleculares termodinamicamente estáveis e substâncias orgânicas e inorgânicas predominam, algumas com um substancial grau de dissociação.

O fenômeno de formação de gelo se torna complexo pela presença de substâncias orgânicas no sistema: inibidores de cristalização (muitos carboidratos), pectina, ácidos orgânicos e certas vitaminas, gelatina, e vários meios protetores e substâncias estabilizantes -manitol, álcoois e glicóis (Maltini e Anselmi, 1971), essas substâncias formam uma extensa zona eutética, onde a fusão incipiente é acompanhada por um moderado efeito endotérmico (Monzini, 1973). Durante o congelamento de soluções contendo inibidores de cristalização, os cristais de gelo e a solução líquida subresfriada são formados, o último solidificando em uma massa vítrea à medida em que a temperatura decresce (Flink, 1975, Mackenzie, 1975 e Simatos, 1976. A devitrificação ou

cristalização da estrutura amorfa segue a transformação vítrea. A baixas temperaturas do produto os danos por mudanças causadas por soluções salinas hipertônicas encontradas na célula vegetativa desaparecem. Consequentemente, é de grande importância a determinação desta temperatura, já que representa o limite máximo de temperatura no qual o produto processa termodinamicamente, e para uma grande extensão química, estabilidade (Guegov, 1981).

A água não congelável é identificada como **água de ligação** em sistemas biológicos. Diz-se esta ter interações fechadas com biopolímeros, e assim possuir propriedades muito diferentes da água livre. A água liga-se a grupos polares de biopolímeros por exemplo, através de pontes de hidrogênio. Essas ligações são estáveis a baixas temperaturas.

Simatos e Turc (1975), sugeriram que o dano pode resultar da transformação da água estruturada em gelo que se supõe capaz de existir na vizinhança de alguns polímeros, ou em ultraestruturas celulares. A interação proteína-água tem um importante papel na determinação da estrutura tridimensional da molécula de proteína bem como na determinação de muitas propriedades funcionais das proteínas em alimentos.

Chou e Morr (1979), em suas discussões sobre interações água-proteína, dividiu-as em seis tipos. O primeiro é a água estrutural, ligada por pontes de hidrogênio à molécula de proteína. A água estrutural estabiliza a estrutura nativa e é encontrada dentro da macromolécula. O segundo tipo de água é a presente como monocamada, que preenche a primeira camada adsorvida em torno da proteína. Ligada também por pontes de hidrogênio ou interações dipolares, cerca de 4-9% da água associada com a proteína é adsorvida à superfície desta. O terceiro tipo é a água ligada, água não congelável que representa a água total agrupada em torno de cada grupo polar. Esta água não congela a uma profunda temperatura de transição e pode incluir a água estrutural e monocamada. A quantidade de água não congelável depende da composição dos aminoácidos da proteína e cadeias laterais polares. Pesquisas têm reportado que um grama de proteína pode ter de 0,3 a 0,5g

de água associada não congelável. O quarto tipo d'água é a água associada com a molécula de proteína via hidratação hidrofóbica. Esta água tem sido descrita como água estruturada tipo gelo, mas a natureza real desta não está muito clara. O quinto tipo é a água de embebição ou capilaridade que é tomada fisicamente por forças superficiais. Esta água está disponível para reações químicas e atua como solvente. O sexto tipo de água, hidratação hidrodinâmica, é aquela que é transportada ao longo da molécula. Esta água é independente da a_w e tem as propriedades físicas normais da água.

No congelamento de um sistema contendo peptídeos, a distância entre o peptídeo e o oxigênio é cerca de 4,8 Å que é a mesma das distâncias secundárias vizinhas do oxigênio na grade de gelo. A grade do tipo gelo pode posicionar-se acima de uma camada polipeptídica e exatas ligações de hidrogênio colineares podem ser formadas a cada posição para satisfazer ao requerimento do peptídeo e da água. Esta ligação pode ser importante na estabilidade do esqueleto do polipeptídeo (Schnepf, 1989).

Um dos maiores problemas no congelamento de misturas contendo ovos é a perda d'água do gel. As cadeias de proteína unem-se, resultando na expulsão d'água do gel. Gossett e Baker (1983) estudaram dois métodos usados com a finalidade de aumentar a carga negativa na proteína, aumentando o pH e por succinilação. Quando o pH da mistura foi elevado para pH 9,5 ou mais, a percentagem de umidade expressiva decresceu (menos água livre). Ânions de succinato ligam-se a 2 grupos carboxílicos causando ganho em cargas negativas. A interação proteína-proteína pode decrescer causando um aumento na interação proteína-água.

Proteínas interagem com a superfície do cristal alterando a estrutura da camada adsorvida ou alterando a própria estrutura superficial. Se as proteínas do soro afetam a taxa de crescimento dos cristais de gelo, elas podem também afetar a estrutura microscópica da superfície. Por

exemplo, se a taxa de crescimento dos cristais de gelo decresce devido a presença das proteínas do soro, a superfície pode tornar-se lisa (Hartel, e Chung, 1993).

Organismos tolerantes a geadas tais como insetos, répteis e moluscos produzem proteínas que funcionam como nucleantes de gelo para iniciar a formação de gelo extracelular. Contudo, insetos tolerantes a geadas também produzem AFPs (Antifreeze Proteins) que modificam os cristais de gelo que se formam fora das células. Griffith et al. (1992), estudaram o centeio de inverno, uma herbácea monocotiledônea que pode sobreviver abaixo de -20°C pela formação de gelo somente intercelular. Na água pura, o gelo normalmente cresce paralelamente ao plano basal (eixo a) da grade cristalina, com pequeno crescimento perpendicular ao plano basal (eixo c), já que os cristais de gelo aparecem achatados e redondos. Baixas concentrações (nM) de AFP, preferencialmente, inibem o crescimento do gelo ao longo do eixo a de tal modo que, as faces do prisma hexagonal do cristal se tornem evidentes (Fig.19). Em uma maior concentração (μM) de AFP, o cristal cresce predominantemente ao longo do eixo c para formar bipirâmides hexagonais e cristais em forma de agulhas (Fig.20).

A histerese térmica (diferença entre o congelamento e a temperatura de fusão), é determinada observando o efeito da temperatura no crescimento de um cristais de gelo individual. Foi mostrado que os cristais de gelo formados no extrato apoplástico obtido do centeio de inverno tolerante ao congelamento, exibiu mudanças na morfologia e na histerese térmica que são consistentes com a atividade definida para as AFPs. As AFPs reduzem a T_m da solução por efeito coligativo. Por outro lado, as AFPs reduzem a temperatura de congelamento de uma solução mais do que a temperatura de fusão por efeitos não coligativos, ex.: sujeitando as faces do prisma e inibindo o crescimento dos cristais de gelo. Os cristais formados no extrato apoplástico do centeio de inverno não aclimatado ao frio são levemente hexagonais com crescimento não discernível no eixo c ou mensurável histerese térmica. O fato de que estes são levemente hexagonais, indica que

o extrato de centeio de inverno não aclimatado contém uma quantidade mínima de atividade anticongelante que pode ser detectada pela técnica utilizada. Todo extrato de centeio de inverno aclimatado ao frio formou cristais de gelo hexagonais no congelamento. A temperatura ao ser reduzida promovem a expansão desses cristais, primeiramente, ao longo do eixo *c* para formar pirâmides hexagonais incompletas e então ao longo do eixo *a* para formar colunas hexagonais e largas placas de gelo hexagonais.

A formação do gelo hexagonal e o crescimento dos cristais de gelo ao longo do eixo *c* são ambos indicativos da atividade das AFPs no extrato apoplástico bruto do centeio de inverno aclimatado ao frio. Quando este é incubado com protease por 20min, a atividade é reduzida. No lugar da formação parcial de cristais bipiramidais, o extrato forma placas hexagonais. Após 1h de incubação com protease, toda a atividade anticongelante desaparece e somente finos cristais redondos (característica dos cristais formados em água destilada), foram observados. Esses resultados suportam a conclusão de que a atividade anticongelante no centeio de inverno é derivada da proteína.

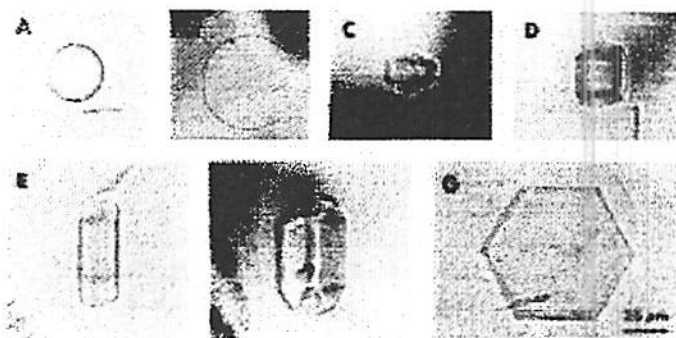


FIGURA 19. (A) cristais de gelo formados em água destilada, plano basal paralelo ao eixo da página. (B) cristal de gelo formado em extrato de centeio de inverno não aclimatado ao frio, sem crescimento visível ao longo do eixo *c* (visto normal ao plano da página). (C - F) sequência de crescimento de cristais de gelo a medida que foi-se reduzindo a temperatura em extrato de centeio de inverno aclimatado ao frio, faces prismáticas hexagonais ao longo do eixo *c* (vista paralela ao eixo da página). (G) coluna de gelo hexagonal orientada ao longo do eixo *c* (vista normal ao eixo da página). (Griffith et al., 1992).

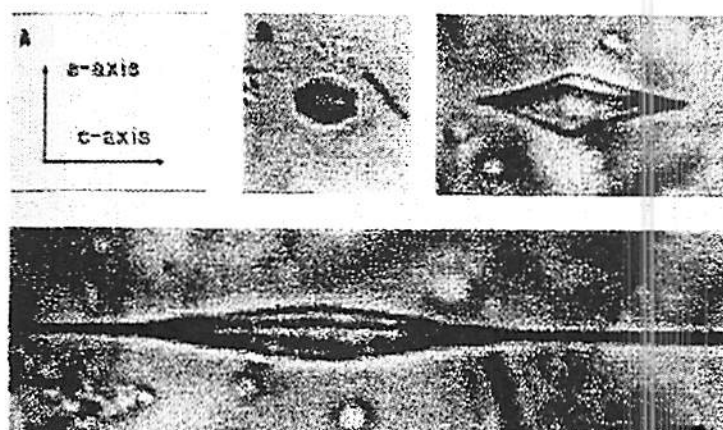


FIGURA 20. Morfologia de cristais de gelo em concentrados de proteínas anticongelantes parcialmente purificados de folhas de centeio de inverno aclimatados ao frio. (A) orientação dos cristais de gelo. (B-D) sequência de crescimento de um cristal de gelo a medida que a temperatura foi reduzida. (B) bipirâmide incompleta. (C) bipirâmide. (D) forma de agulha. (Griffith et al., 1992).

Ainda segundo Griffith et al. (1992), o processo de congelamento é iniciado no apoplasto dos tecidos vegetais por nucleação heterogênea do gelo. A localização desses nucleantes de gelo determina a distribuição inicial do gelo no tecido, contudo o tamanho e efetividade desses nucleantes determinam a temperatura na qual o gelo é formado. Enquanto o gelo extracelular começa a formar-se, o crescimento e propagação através da planta é restrito por um número de fatores, incluindo modificações na parede celular, arabinosilanas e AFPs. As AFPs se adsorvem nos cristais de gelo e modificam seu crescimento normal. A altas concentrações, as AFPs deprimem a temperatura de congelamento de uma solução não coligativamente sem afetar a temperatura de fusão. Esta propriedade, conhecida como histerese térmica, é importante no decréscimo do ponto de congelamento de peixes polares expostos à presença de gelo em água

marinha. Contudo, em menores concentrações, as AFPs são também potentes inibidores da recristalização do gelo. O acúmulo dessas proteínas pode ser quantitativamente, correlacionada com o aumento da tolerância ao congelamento que ocorre durante a aclimação ao frio. Contudo, algumas dessas proteínas tem atividade anticongelante ao modificar o crescimento normal de cristais de gelo, presentes em concentrações tão baixas quanto $25\mu\text{g}$ proteína mL^{-1} . A altas concentrações ($60\mu\text{g}$ proteína mL^{-1}), essas proteínas também produzem $0,3^\circ\text{C}$ de histerese térmica.

O gelo cresce em água, normal ao eixo c para formar um cristal em forma de disco. Quando as AFPs são adsorvidas na superfície de um cristais de gelo, o crescimento do cristal ao longo do eixo a é exibido, até que este tome forma hexagonal. A uma maior concentração de AFP, o eixo c torna-se a direção preferida de crescimento dos cristais de gelo e este forma uma bipirâmide hexagonal. Assim, o cristal de gelo formado como um disco, uma lâmina hexagonal, e uma bipirâmide hexagonal, representa zero, baixa e alta atividade anticongelante, respectivamente, em uma escala qualitativa.

Diferentes tipos de AFPs adsorvem a diferentes planos na superfície de um cristal de gelo. Assim, as faces retas de cristais piramidais formados em extratos de centeio, transferidos para 5°C por 1 semana, provavelmente indicam a presença de uma única AFP que adsorve sobre um plano da grade do cristal. A maior complexibilidade das faces de cristais de gelo piramidais formados em extratos de centeio, desenvolvidos a 5°C , pode indicar a presença de múltiplas AFPs, cada uma delas ligando-se em diferentes plano da grade cristalina. Cada classe de proteínas do centeio, que são definidas pela similaridade com as glucanases, quitinases ou proteínas tipo taumatina (TL), podem ser adsorvidas sobre um plano diferente na superfície do gelo, produzindo assim um efeito cooperativo que pode promover a efetividade da inibição de crescimento dos cristais. Este mecanismo de ligação cooperativa pode explicar a complexa morfologia dos cristais

de gelo que se formam no extrato de plantas aclimatadas ao frio por 3 a 7 semanas. Por causa das faces piramidais do gelo formado nos extratos aclimatados por 1 semana serem planos, conclui-se que somente uma AFP está presente neste extrato. É comum assumir que as AFPs ligam-se ao gelo por dispor de uma superfície na qual os resíduos de aminoácidos polares estão alinhados especificamente para permitir ótimas interações com a grade dos cristais de gelo. A função principal das AFPs nas plantas não é a de impedir o crescimento de cristais de gelo, mas preferivelmente, modificar o crescimento dos cristais extracelulares e inibir a recristalização do gelo. Essas propriedades das AFPs são, provavelmente, de muito maior importância do que a histerese térmica observada com a redução do dano pelo congelamento em plantas tolerantes ao congelamento (Hon et al., 1995).

A habilidade dos peptídeos para desenvolver atividade anticongelante e para alterar a velocidade de crescimento do gelo nos eixos *a* e *c* é dependente da presença resíduos de aminoácidos posicionados apropriadamente com ligações de hidrogênio em cadeias laterais. Em baixas concentrações, as AFPs através de interações dipolares e pontes de hidrogênio, interagem com as faces prismáticas do gelo retardando seu crescimento no eixo *a*. Contudo, em concentrações o suficientemente altas de AFPs ativas, sucede também o retardamento da velocidade de crescimento no eixo *c*. Consequentemente, a AFP também pode interagir com o plano basal (Feeney e Yeh, 1993). Um cristal de gelo é birefrigente quando o eixo ótico, que coincide com o eixo cristalográfico *c*, é perpendicular à direção de propagação do plano da luz polarizada (Fig.21). Foi proposto um modelo pelo qual as ligações de hidrogênio induziriam as moléculas d'água na superfície do gelo alinharem seus dipolos antiparalelamente ao campo dipolar da hélice da AFP. Isto direcionaria a formação de um dipolo resultante na superfície do gelo com ligações diretas de hidrogênio da AFP com a face prismática. Esta ligação previne o crescimento do gelo ao longo do eixo *a*. Diferenças na sequência de aminoácidos, estrutura secundária,

comprimento molecular ou momento dipolar dos peptídeos pode somar para a presença ou ausência da atividade das AFPs. Nove resíduos de aminoácidos na sequência de AFP nativa, alinham-se ao longo de uma face da hélice e são prováveis sítios de interações com o gelo (Tabela 2). (Chakrabartty, Yang e Hew, 1989).

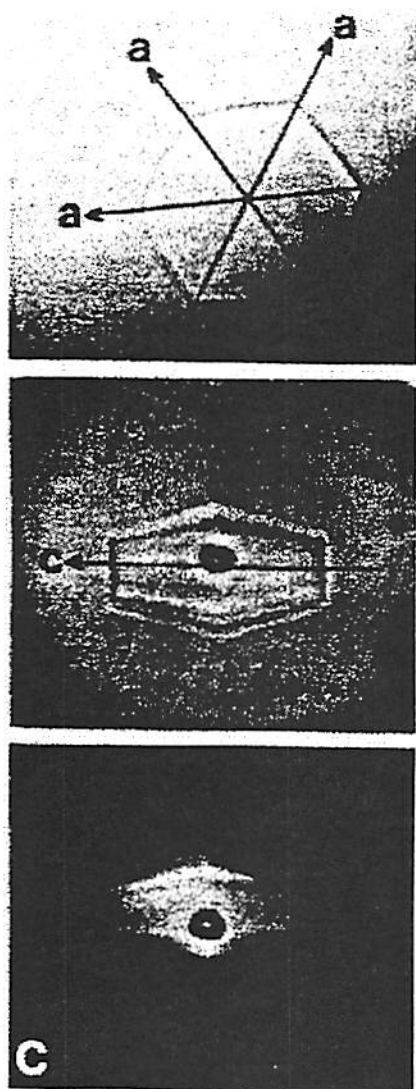


FIGURA 21. Microfotografias do crescimento de cristais de gelo em soluções contendo proteínas e peptídeos. (A) Soroalbumina bovina (10mg/ml). (B) e (C) Asp-Arg (0,26mM). (Chakrabartty, Yang e Hew, 1989).

TABELA 2. Estruturas primárias de polipeptídeos anticongelantes sintéticos

Peptídeo	Sequência de aminoácidos
Asp ... Arg	<u>DTASDAAAAAALTAANAKAAAELTAANAAAAAAATAR</u>
Thr ... Arg	<u>TASDAAAAAALTAANAKAAAELTAANAAAAAAATAR</u>
Asp ... Arg	<u>DAAAAAALTAANAKAAAELTAANAAAAAAATAR</u>
GluLeu ... Arg	<u>ELTAANAKAAAELTAANAAAAAAATAR</u>
Leu ... Arg	<u>LTAANAKAAAELTAANAAAAAAATAR</u>
Glu ... Arg	<u>ELTAANAAAAAAATAR</u>
Leu ... Arg	<u>LTAANAAAAAAATAR</u>

Nota: Todos os peptídeos foram sintetizados como terminais amida COOH. Os resíduos de aminoácidos que têm o potencial para ligação de hidrogênio com a grade do gelo estão sublinhados (Chakrabarty, Yang e Hew, 1989).

Warner (1981), revê alguns mecanismos propostos para a interação gelo-carboidratos.

Na Fig.22 pode observar-se que os seis oxigênios do açúcar são equivalentes aos seis oxigênios da camada de gelo. Contudo, há algumas diferenças. Por exemplo, os planos 1-3-5 e 2-4-6 não têm a mesma distância dos planos de gelo correspondentes. Emprega-se um ângulo de $104^{\circ}45'$ (ao invés do usual ângulo do gelo tetraédrico de 109°). Presume-se então que camadas d'água se unem reduzindo as distâncias das intercamadas no açúcar. Outras diferenças referem-se às direções ligantes permissíveis. Os polímeros que contêm piranoses e a forma β na ligação glicosídica entre as unidades de hexoses podem ser arranjados em uma conformação que permite a inteira cadeia polissacarídea ser encaixada na grade do gelo. Um interessante exemplo é o β -1,3-poliglucan na Fig.23. A estrutura β -1,3 encaixa na grade do gelo e cinco das seis posições do oxigênio de cada hexágono são ocupados por átomos de oxigênio do açúcar. A posição remanescente é ocupada pelo carbono do grupo - CH₂OH incluindo o sexto carbono da unidade piranose (Warner, 1981). O possível encaixe do ácido hialurônico na grade do gelo é mostrado na Fig.24, onde a posição da cadeia é indicada com símbolos atômicos e no esquema da Fig.25. O símbolo M em ambas as

figuras indica a possibilidade de sítios ligantes para um metal monovalente, ligando ionicamente o grupo carboxil do ácido glucurônico envolvido coordenadamente com o 4-hidroxil e 6-hidroxil do resíduo do n-acetilglucosamina (Warner, 1981).

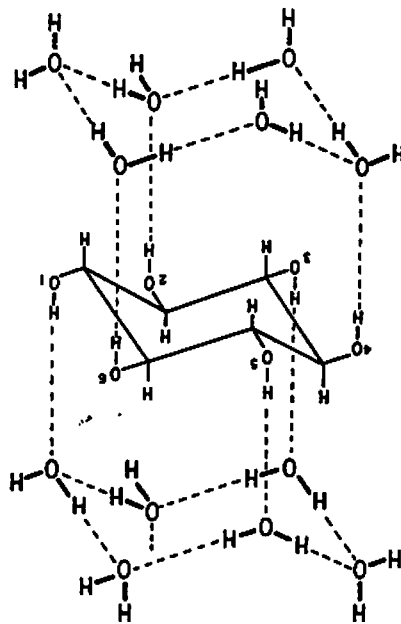


FIGURA 22. Scyllo-inositol inserido em camadas da grade cristalina do gelo.

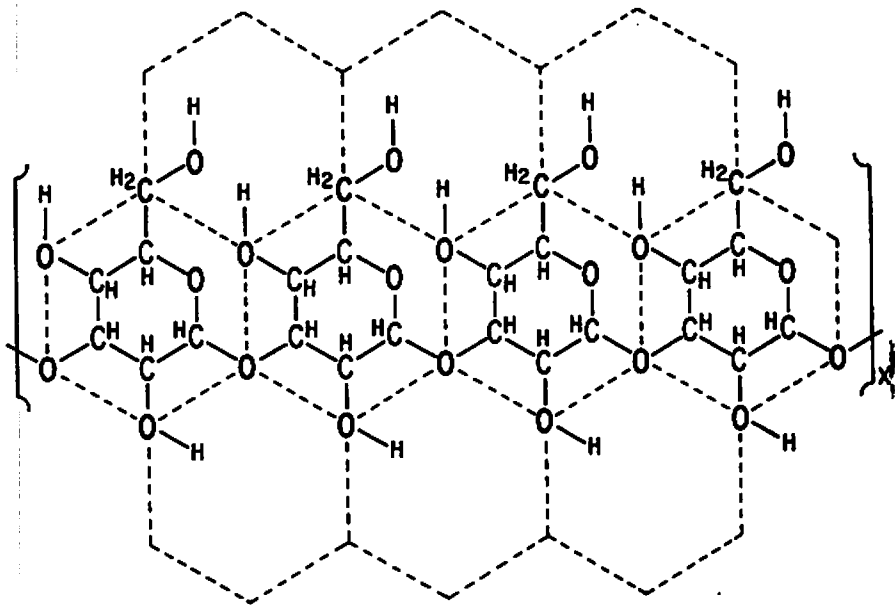


FIGURA 23. β -1,3-poliglucano na grade cristalina do gelo.

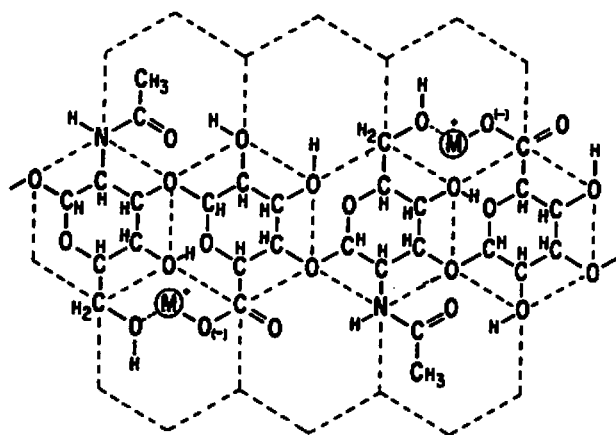


FIGURA 24. Desenho esquemático do ácido hialurônico na grade cristalina do gelo. M, metal monovalente. ----, ligações com o gelo na camada adjacente.

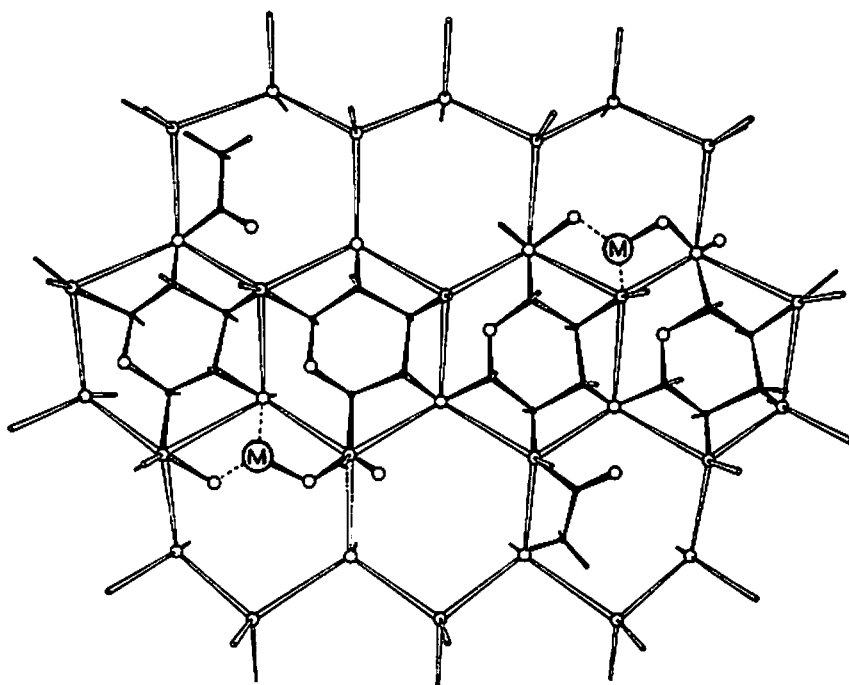


FIGURA 25. Ácido hialurônico na grade cristalina do gelo. Desenho do modelo espacial de Dreiding.

Mudanças na temperatura e tamanho dos cristais de gelo obtidos teoricamente estão bem de acordo com os medidos experimentalmente em água pura e solução de 5% de dextrana (Shirai et al., 1985a). A Fig.26 mostra fotografias de cristais de gelo formados em água pura e solução de 5% de dextrana T500. Cristais de gelo em forma de discos foram observados em água pura e solução de dextrana. Os cristais formados em água apresentaram uma superfície mais fina e transparente, enquanto um padrão de propagação radial de pequenos grãos como bolhas e algumas valas no lugar foram observadas na superfície dos cristais formados em solução de dextrana. A relação elevação/diâmetro dos cristais foi determinada pela medida da elevação e do diâmetro dos cristais de gelo flutuante verticalmente nas amostras sob um ampla faixa de subresfriamento. Os raios médios de 42 e 80 cristais foram 0,141 e 0,131 para água pura e solução de Dextrana T500, respectivamente.

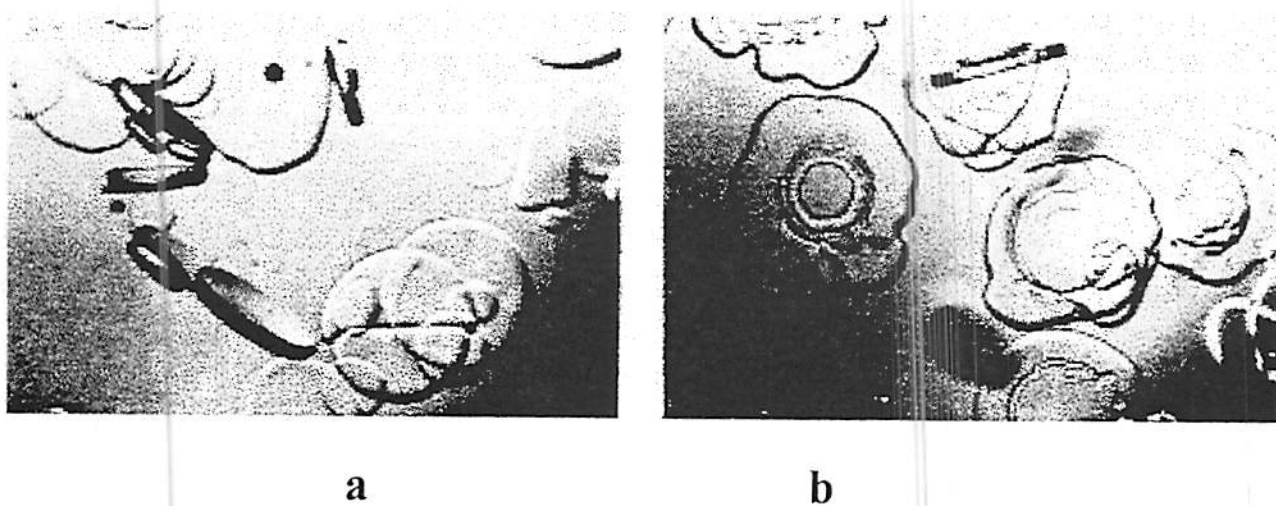


FIGURA 26. Microfotografias de cristais de gelo formados em água pura (a) e em 5% de solução de Dextrana T500 (b) a uma magnificação de 20x. $\Delta T^\circ = 055$ (Shirai et al., 1985a)

Shirai et al. (1985b), estudaram a cinética de cristalização do gelo, em soluções de polímeros diversos, pela resposta térmica em um cristizador. Alguns polímeros tais como o polietileno glicol suprimem a nucleação. Contudo, a maioria dos estudos são limitados à nucleação homogênea. Estes autores citam que embora Omran e King (1974) tenham mostrado que a pectina suprime a nucleação dos cristais de gelo, que ocorre na presença de cristais vistos a subresfriamento lento, não se costuma estudar a nucleação secundária de cristais de gelo em soluções poliméricas. A Fig.27 mostra típicas fotografias de cristais de gelo formados em água pura e 1,5% de solução de sulfato dextrana. Cristais transparentes e em forma de discos foram observados em água pura. Os cristais formados em todas as soluções usadas neste estudo tiveram também a forma de discos, com pequenos grãos como bolhas irradiando do centro dos cristais de gelo. A taxa de crescimento não decresceu significativamente com a adição de polímeros, já que uma pequena depressão no ponto de congelamento foi observada e o decréscimo no coeficiente de transferência de calor calculado, com um aumento na viscosidade, foi insignificante no campo experimental.

Em cristalizadores, com o aumento da viscosidade, a frequência de colisões entre os cristais de gelo e as paredes ou impulsores do cristizador decrescem e conseqüentemente a velocidade de nucleação pode decrescer. Fatores microscópicos como peso molecular, forma das moléculas e interações entre estas, podem contribuir para o decréscimo da nucleação secundária (Shirai et al., 1985b). Os cristais de gelo observados nas soluções poliméricas foram maiores do que na água. Isto é devido a que a taxa de nucleação decresce em soluções poliméricas. Em soluções mistas de lactose e dextrana o tamanho médio dos cristais são maiores do que em soluções de lactose, e menores do que aqueles encontrados em soluções de 5% de Dextrana T500. Estes resultados indicam que a taxa de nucleação decresce igualmente nas soluções de lactose pela adição de compostos de alto peso molecular, e que o efeito de cada soluto nos parâmetros da

cinética podem ser independentes nas soluções mistas. O leite desnatado contém cerca de 10% de lactose. O tamanho médio dos cristais de gelo no leite desnatado foram maiores do que na solução de lactose. Proteínas no leite desnatado podem também contribuir para o aumento do tamanho médio dos cristais. A nucleação secundária dos cristais de gelo foram suprimidas pelos polímeros dependendo da viscosidade nas soluções (Shirai et al., 1985b).

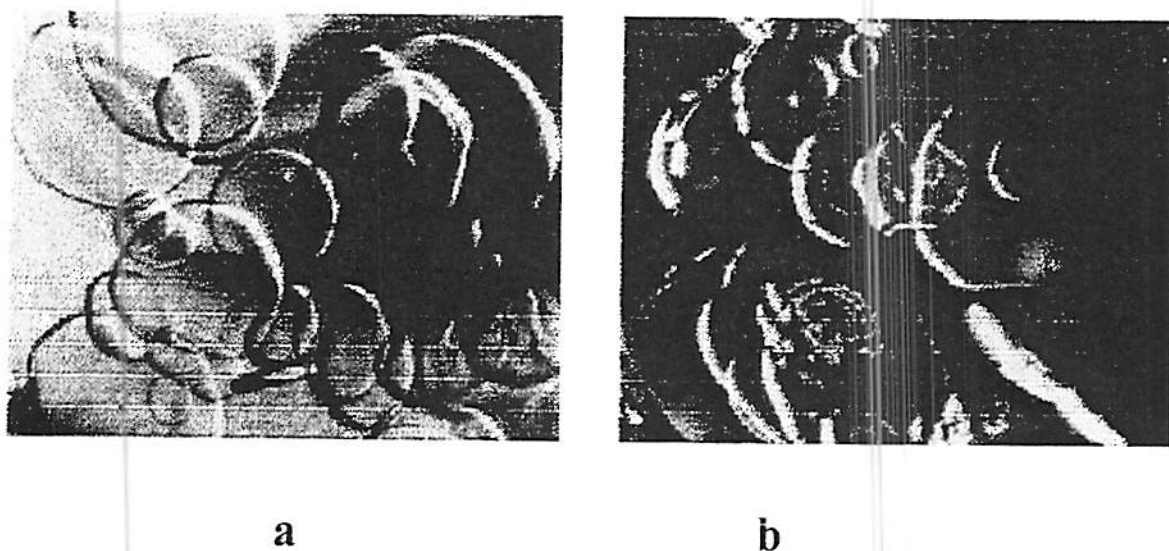


FIGURA 27. Cristais de gelo formados em água pura (a) e solução contendo 1,5% de sulfato de dextrana (b). (Shirai et al., 1985b).

A água interage com íons e grupos iônicos. A estrutura normal da água pura (arranjo tetraédrico) é destruída pela adição de solutos com habilidades dissociativas. Para simples íons orgânicos que não possuem sítios ligantes de hidrogênio doadores ou receptores, a ligação é meramente polar (ex., NaCl). Há bastante evidência para assumir que alguns íons diluídos em soluções aquosas conseguem quebrar a estrutura da rede (uma solução mais flúida do que a água

pura), outros porém têm um efeito formador de estrutura (uma solução menos fluida do que a água pura). O termo **estrutura de rede** refere-se a todas as classes de estruturas normais ou novos tipos de estrutura da água. Do ponto de vista da água normal, todos os íons são destrutivos e eles assumem a função de impedir a formação do gelo. Íons monovalentes (carregados negativamente ou positivamente) tais como K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , BrO_3^- , IO_3^- e ClO_4^- têm campo elétrico fraco e normalmente agem como destruidores da estrutura de rede. (Schnepf, 1989).

Assumindo o sistema alimentar como um gel aquoso, ser congelado unidirecionalmente e adotando uma morfologia tipo celular (Fig.28). Tem-se o espessamento progressivo dos dendritos a uma concentração com perfil parabólico de soluto no líquido interdendrítico. O espaço dendrítico ao início do congelamento ajusta-se a uma função da velocidade de resfriamento para preservar um pequeno e constante subresfriamento. No caso de soluções com baixas concentrações, a largura final do dendrito, denominada dp , é praticamente igual ao espaçamento dendrítico L . A diferença de concentração é assumida como sendo igual à diferença de concentrações presente entre a ponta do dendrito e o centro do líquido interdendrítico. Existe também uma relação linear entre o tamanho médio dos cristais de gelo e a posição da frente congelante (Woinet et al., 1997).

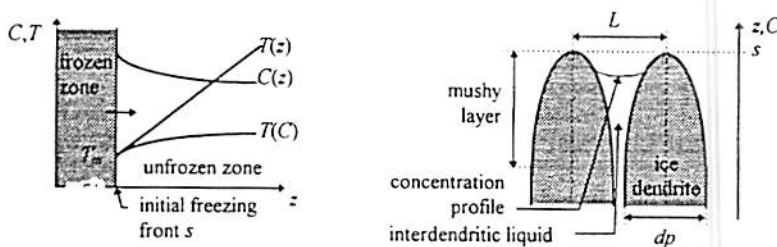


FIGURA 28. Detalhe da frente congelante. (Woinet et al., 1997).

2.5 Danos físico-mecânicos em frutos congelados

Em frutas e vegetais as mudanças de volume (frequentemente não homogêneas) durante o congelamento originam desprendimentos de porções celulares; provavelmente rompem as paredes celulares e portanto são a causa da perda de líquido por exudação durante o descongelamento. Também podem provocar sua ruptura completa o congelamento e expansão do interior que ocorrem depois da formação de uma crosta externa congelada.

Observações microscópicas indicam que os grandes cristais de gelo separam as fibras e células entre si, ao mesmo tempo em que as paredes destas últimas estão frequentemente desprendidas. Isto motiva a morte do tecido e contribui para o decréscimo da turgência e o aumento da exudação ao descongelar. A ruptura das paredes celulares resulta da ação mecânica dos grandes cristais de gelo que nos tecidos vegetais se formam especialmente na lamela média devido a uma permanência prolongada em um meio hipertônico ou o encolhimento excessivo das células. Estas alterações microestruturais se produzem também quando os pequenos cristais resultantes de um congelamento rápido recristalizam durante o descongelamento. A expulsão de uma parte do conteúdo celular tem as vezes o efeito de por em contato enzimas e substratos (Cheftel, Cheftel e Besançon, 1982).

Sabe-se, devido particularmente a observações microscópicas, que quando uma suspensão de células sofre resfriamento lento, inicia-se a cristalização do gelo no meio externo levando a uma gradual desidratação das células. O resfriamento rápido, ao contrário, resulta na cristalização intracelular. O resfriamento ultra-rápido pode levar a uma vitrificação da água intracelular. Mas se o desenvolvimento dos cristais de gelo (por devitrificação ou recristalização migratória) pode ser evitado durante o aquecimento, esta operação também pode ser rápida. Fennema, Powrie e Marth (1973) cita vários autores que descrevem sobre o congelamento da água

durante o período inicial do resfriamento, resultando este em uma concentração gradual de líquido intersticial, que pode levar a vários processos de alteração:

(a) Forte concentração eletrolítica. A sensibilidade das proteínas para eletrólitos é bem conhecida. Em alguns casos, a força iônica é o fator determinante; a natureza dos íons pode em outros casos atuar de modo específico. Estudos indicam uma relação próxima entre a concentração dos líquidos intersticiais e o dano por congelamento às células vivas.

(b) As membranas das hemáceas do sangue são danificadas durante o congelamento, as lipoproteínas são dissolvidas por soluções eletrolíticas altamente concentradas. Como resultado, íons extracelulares escoam nas células. As células sofrem hemólise durante o descongelamento por causa da alta pressão osmótica interna devido a esses íons (Lovelock, 1957).

(c) A hemólise pode também ser induzida pela alta concentração de outros solutos tais como sacarose, e que o volume das hemáceas não decresce por criosinereze além de um mínimo definido. De acordo com Meryman (1968), a célula quando tomada além do volume reduzido, é submetida a um gradiente osmótico que promove injúrias às membranas e entrada de íons na célula.

(d) Variações do pH. A sucessiva cristalização de eutéticos em sistemas biológicos pode levar a consideráveis mudanças no pH (van den Berg, 1959).

(e) Ligações intermoleculares. Eventualmente, ligações irreversíveis podem ser formadas entre solutos trazidos ao contato pela separação do gelo. Esta hipótese tem sido sugerida por Lovelock como outro possível mecanismo para a desnaturação das membranas lipoproteicas. De acordo com Levitt (1962), as ligações dissulfetos podem ser formadas pela oxidação dos grupos -SH ou intermudanças entre -SH e S-S. Também pode-se pensar em pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou forças eletrostáticas entre grupos iônicos.

A quantidade de água que permanece na célula ao final da criosinereze, que é responsável por formar o gelo intracelular, depende por um lado da velocidade de resfriamento e por outro da velocidade com a qual o gelo se converte em água. Estes últimos parâmetros apontam para a importância da permeabilidade da membrana e tamanho da célula. Além disso, o efeito injuriante das altas concentrações é variável de acordo com a espécie celular: leveduras podem certamente ser classificadas entre as menos sensíveis (Mazur, 1963).

Outros fenômenos podem levar a alterações nos sistemas biológicos, especialmente aqueles relacionados com a função estrutural da água. Já que a conformação de biopolímeros é determinada em grande extensão pelas propriedades do solvente, esta é responsável por mudanças com temperatura. Se a forma nativa é estável sob condições normais de temperatura para o sistema sob estudo, a mudança de temperatura pode induzir a desnaturação. De acordo com Brandts (1970), como a estabilidade das interações hidrofóbicas decresce com a temperatura, algumas proteínas podem sofrer uma trans-conformação quando resfriadas; a desnaturação é reversível ou não de acordo com a substância.

Em tecidos, a cristalização uniforme é essencialmente sinônimo de cristalização intracelular porque os espaços extracelulares representam comumente uma pequena fração do volume do tecido. A velocidade necessária para produzir cristalização uniforme aumenta, geralmente, quando o tamanho das células decresce. Como as células contêm uma maior concentração de íons não difusíveis (ex., proteínas) do que o fluido circundante, cada íon difusível existiria numa concentração desigual nos lados opostos da membrana celular e a concentração total de partículas iônicas, por unidade de massa, seria maior dentro do que fora da célula. Com base nisto, um ponto de congelamento mais baixo pode ser esperado para o conteúdo celular do que para o fluido circundante.

A capacidade de retenção da água é um termo frequentemente empregado para descrever a habilidade da matriz de moléculas, usualmente macromoléculas, para reter uma certa quantidade de água, de tal modo que a exudação seja evitada. Exemplos em alimentos incluem gel de pectina e amido, e tecidos de origem animal e vegetal. Nessas situações, uma pequena quantidade de material orgânico retém fisicamente grandes quantidades de água. A preservação dos tecidos por congelamento resulta muitas vezes em um decréscimo indesejável na capacidade de retenção d'água. Sabe-se que um aumento na concentração dos materiais dissolvidos afeta colóides tais como proteínas que podem ser desnaturadas e afetar desfavoravelmente sua capacidade de ligação com a água, sua solubilidade e propriedades texturométricas. Isto também se aplica a enzimas e microrganismos. Sabe-se que proteínas e outros polímeros podem absorver grandes quantidades d'água após o descongelamento. Esta é uma das razões pelas quais a água que contenha materiais dissolvidos exuda, juntamente com estes materiais, dos produtos descongelados. A intensidade com que isto ocorre depende, principalmente, da velocidade de remoção d'água e do tempo de armazenamento. A baixa a_w resultante afeta a atividade enzimática (Leniger e Beverloo, 1975).

A formação do gelo também envolve aspectos mecânicos. Em certos casos, muitos cristais podem danificar as paredes celulares promovendo a compactação das células. Em alguns casos tem-se uma alta probabilidade para uma membrana como o tonoplasto, que envolve um vacúolo de uma célula vegetal, possa ser danificada. Isto resulta em desordem do conteúdo celular e conduzindo à completa desorganização da célula. Estes efeitos podem ser intensificados quando a água se expande no processo de congelamento. Durante o congelamento de soluções aquosas, a água presente é transferida para o cristal de gelo. A extensão da concentração é influenciada, principalmente, pela temperatura final e, em menor grau, pela temperatura eutética do soluto presente, agitação e taxa de resfriamento.

Leibo e Mazur (1971) demonstraram que dois fatores são responsáveis pelo dano por congelamento. O efeito das soluções reflete o fato de que as células resfriadas a velocidades não ótimas morrem por exposição prolongada a soluções concentradas as quais mudam as propriedades físicas e químicas como ocorre no meio congelado extracelularmente. Quando a velocidade de resfriamento é aumentada, aumenta a sobrevivência celular, refletindo uma exposição mais curta a tais soluções alteradas. O segundo fator, o congelamento intracelular, reflete o fato de que as células resfriadas a taxas mais altas do que a ótima são mais prováveis de congelar intracelularmente, já que não há tempo suficiente para a água celular se difundir para fora da célula em resposta à pressão diferencial de vapor entre o meio externo congelado e a solução interna subresfriada.

Com a formação do gelo, a fase remanescente da solução torna-se mais concentrada. Se as membranas celulares permitem a passagem de gelo, tem-se uma consequente desidratação celular pelo processo de osmose. Dependendo da velocidade de resfriamento e da permeabilidade da parede celular, componentes celulares podem sofrer subresfriamento. Com um resfriamento suficientemente rápido, as células podem congelar internamente (van den Berg, 1968).

Distúrbios das propriedades funcionais das células causados pelo congelamento ocorrem especialmente em células parenquimais de parede fina de frutos. Entre estes tem-se a coagulação do plasma (plasmólise) que promove a separação irreversível do plasma da parede celular e a liberação irreversível d'água; perda da semi-permeabilidade das membranas, resultando no decréscimo do turgor celular e secção dos tecidos pelo dano a substâncias da parede celular como a pectina (Spiess, 1980).

Quando o gelo é formado, gases dissolvidos se concentram e saem da solução. Durante o aquecimento, com a fusão do gelo, estas bolhas podem coalescer. Grandes bolhas têm propriedades oxidantes e podem causar também danos mecânicos como aqueles promovidos pela

frente congelante. Para minimizar o dano e maximizar a sobrevivência celular, velocidades de resfriamento que promovam o encolhimento ou a formação do gelo devem ser evitadas (Thomas e Smith, 1994).

A teoria sobre a ação de grandes cristais diz que, principalmente os que se apresentam na forma de agulhas, danificam mecanicamente as estruturas celulares. A formação de cristais intracelulares, qualquer que seja seu tamanho, sempre destrói a organização interna das células, alterando o metabolismo e provocando a morte das mesmas (Cheftel, Cheftel e Besançon, 1982).

A intensa cor amarela em abacaxis é principalmente devida aos carotenóides que se tornam predominantes no amadurecimento com o decréscimo de clorofila. Os processos de congelamento e descongelamento levam à desintegração das células, degradação dos pigmentos e isomerização de carotenóides (Bartolome, Ruperez e Fuster, 1996).

A distribuição do gelo em botões de flores no inverno de várias espécies tem sido examinada usando espécimes frescas e tecido criofixado (Ashworth, 1990). Ristic e Asworth (1993) demonstraram a falta de evidência direta para a existência de injúria celular em algumas plantas lenhosa submetidas ao congelamento. O congelamento intracelular nestas plantas resulta em injúria letal. Em contraste, tecidos de outras plantas lenhosas e herbáceas sobrevivem ao congelamento por serem tolerantes à formação do gelo extracelular.

Warmund (1993), estudou o gelo formado intercelularmente em tecidos da coroa de morangos frescos. O formaldeído utilizado na criofixação preservou os espaços formados pelo gelo extracelular e mostrou que as células adjacentes aos vazios, não sofreram colapso permanente. O colapso celular não foi aparente em coroas congeladas rapidamente a uma temperatura letal de -50°C e, subsequentemente descongeladas. Assim, o gelo pode ter-se formado intracelularmente devido ao rápido resfriamento, mantendo a integridade celular após o descongelamento. Segregação de gelo extracelular tem sido detectada em botões florais inativos

de plantas lenhosas subresfriadas. A localização do gelo nestes tecidos pode ser causada pelo baixo potencial osmótico do precursor floral quando comparado com tecidos adjacentes (barreira dos tecidos nos eixos dos botões, morfologia do botão e diferenciação vascular ou a presença de nucleantes intrínsecos de gelo). Não se sabe ao certo se estes fatores influenciam a formação do gelo extracelular em plantas herbáceas tolerantes ao congelamento. Foi observado que a formação de gelo extracelular a -5°C não injuriou morangos permanentemente, embora a estrutura da coroa tenha sido rompida temporariamente. O gelo extracelular foi observado em coroas de morangos próximos à base do pendunculo e adjacente ao sistema vascular quando exposto a temperaturas subletais.

Quando o congelamento de tecidos de botões de flores de *forsythia* foi examinado por Ashowrth (1990) usando técnicas de análise térmica, dois distintos eventos de congelamento foram detectados: 1) a poucos graus abaixo de 0°C deu-se o congelamento d'água nas escamas dos botões. 2) a exoterma de baixa temperatura correspondeu ao congelamento da fração d'água subresfriada o qual foi correlacionado com a temperatura letal. Experimentos com espécies como *Prunus* e *Rhododendron* sugeriram que o desenvolvimento de órgãos florais era necessário para a tolerância à formação de gelo. Quando a formação do gelo foi iniciada nesses tecidos, os órgãos florais inteiros congelaram integralmente. Além disto, quando os floretes foram inoculados com cristais de gelo, os botões morreram a temperaturas abaixo dos valores reconhecidamente letais. Essas observações levaram a concluir que alguma forma de barreira pode estar presente nos tecidos que previne a propagação do gelo no sistema floral. A distribuição dos espaços vazios crio-fixados sugere uma formação desuniforme ao longo dos botões, mas em sítios bem localizados. A análise da superfície das escamas dos botões revelou a incidência de cristais nas escamas individuais ao invés de cristais intersticiais. Grandes espaços vazios surgem na porção basal das escamas dos botões e espaços menores se observam em outros locais das escamas,

incluindo as porções superiores do tecido. Em todos os casos, as escamas dos botões foram partidas e as camadas celulares separadas. A formação destes cristais parece indicar o tipo de congelamento inicial.

Koster e Lynch (1992) conduziram estudos de compartimentalização para determinar a distribuição de açúcares solúveis dentro de vacúolos e citoplasma de protoplastos de *Secale cereale* L. aclimatado ao frio. Estes autores encontraram que maiores quantidades de açúcares solúveis estavam presentes durante a aclimação em compartimentos fora dos vacúolos. Foi sugerido que o aumento do conteúdo de açúcares no citoplasma pode contribuir para a crioproteção. Contudo, os vacúolos das células parenquimais do xilema da florescência, pode ter menor conteúdo de açúcares do que o citoplasma e isto pode influenciar a nucleação e cristalização da água intracelular.

A hipótese de que danos as células parenquimais do xilema em tecidos subresfriados poderia ser causada pela formação de gelo intracelular, foi testada por Ristic e Ashworth, (1993). Tecidos lenhosos de *Cornus florida* L. foram coletados no inverno, primavera e verão de 1992 e resfriados de 0 a -60°C a uma velocidade de 5°C/h. Observações sugeriram que as células parenquimais do xilema agem como gotas d'água isoladas e que a água celular subresfia a temperaturas próximas a da nucleação homogênea do gelo (-38°C). Tecidos parenquimais, adequadamente preservados por criosubstituição apresentaram em suas microestruturas evidências de formação de gelo intracelular causada por congelamento rápido. Os cristais de gelo, contudo, apresentaram-se pequenos e não romperam severamente a estrutura celular. Organelas, tais como mitocôndrias e cloroplastos, foram facilmente reconhecidas. Em tecidos colhidos no inverno, a primeira evidência de cristalização de gelo intracelular no tecido apareceu a -20°C. A esta temperatura, grandes cristais de gelo foram observados nas células parenquimais. Em algumas células, os cristais de gelo foram localizados somente nos vacúolos e não no citoplasma. Nos

tecidos colhidos na primavera, células com o protoplasma fragmentado foram primeiramente notadas a -5°C . Os primeiros sinais de grandes cristais de gelo intracelulares foram notados a -10°C . Em tecidos colhidos no verão, grandes cristais intracelulares e a fragmentação do protoplasma foram evidentes a -5°C e temperaturas mais baixas. Como observado, as temperaturas nas quais os cristais de gelo intracelulares são formados diferem entre os tecidos coletados em diferente épocas do ano. Isto indica mudanças sazonais na resistência ao frio pelos tecidos lenhosos da florescência. Em muitas células, os cristais de gelo foram notados nos vacúolos e não no citoplasma. Isto sugere que membranas celulares internas, tais como as membranas dos vacúolos (tonoplastos), foram impermeáveis ao gelo e impediram o crescimento interno dos cristais.

Martí e Aguilera (1991), estudaram três tipos de congelamento (ar estático-AE, em placas-P e imersão em nitrogênio líquido-IN) observando o efeito da velocidade de cada um sobre as características mecânicas e microestruturais de arandanos e amoras silvestres. A Tabela.3 mostra os tempos para os três tipos de congelamento. Os tempos de congelamento variaram na razão de 1:6:11 para arandanos e 1:5:8 em amoras silvestres para os congelamentos por IN, P e AE, respectivamente. Estes valores relativos estão de acordo com o previsto pela equação de Plank que estabelece que os tempos de congelamento são inversamente proporcionais: 1) à diferença entre a temperatura inicial do produto e à temperatura do meio de congelamento e 2) ao coeficiente de transferência de calor no processo. Apesar do tamanho médio de ambas espécies de frutos serem semelhantes (14,5 e 16mm), os tempos de congelamento para a amora foram aproximadamente o dobro do requerido para o arandano, independentemente do método de congelamento. Explica-se isto, pela estrutura interna mais uniforme dos arandanos em comparação com a das amoras, que é agregada e fibrosa. O segundo termo da equação de Plank estabelece que

o tempo de congelamento é inversamente proporcional à condutividade térmica do material, que parece ser mais baixa nas amoras do que nos arandanos.

Notou-se ainda que, no caso de arandanos, o congelamento em placas e por imersão IN tiveram um efeito similar na manutenção da firmeza dos frutos, sendo esta inferior a do produto fresco. Para as amoras, o uso de nitrogênio líquido mostrou-se claramente superior aos outros tratamentos e não houve diferenças significativas entre as amostras congeladas em placas ou em ar estático. A tabela.4 mostra o efeito do método de congelamento na perda de suco ou exudato, produzidos durante o descongelamento (Martí e Aguilera, 1991).

TABELA 3. Tempo^a e velocidade de congelamento^b para arandanos e amoras silvestres

Método de congelamento	Arandano		Amora silvestre	
	Tempo (min)	Veloc. (°C/min)	Tempo (min)	Veloc. (°C/min)
Ar estático	22 ± 3	0,6	40 ± 8	0,3
Contato em placas	12 ± 2	3,0	27 ± 5	1,2
Imersão em N líquido	3 ± 1	9,0	5 ± 1	4,4

a Média e desvio padrão

b Medidas no centro térmico ao final do período

TABELA 4. Efeito do método de congelamento sobre a perda de suco em arandanos e em amoras silvestres

Tratamento	Perda de peso (%)	
	Arandano	Amora silvestre
Ar estático	0,56 a	0,58 a
Contato em placas	0,12 b	0,63 a
Imersão em N líquido	0,22 b	0,09 b

Valores seguidos de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente ($P = 0,05$), segundo teste de comparação múltipla de Duncan.

Fuchigami et al. (1994), estudaram a textura e estrutura histológica de cenouras congeladas. Foi investigada a influência da velocidade de congelamento e método de descongelamento mais adequado. Cenouras cruas e branqueadas foram congeladas com nitrogênio líquido-LN₂ (velocidade de -5 ou -2°C/min e temperatura final de -30°C), usando um freezer programado (PF) ou freezers convencionais (-80°C, -30°C e -20°C). As hortaliças foram descongeladas de diferentes modos: descongelamento eletrostático (-3°C, 17h; 5°C, 17h; 20°C, 30min; 100°C, 3min). Quando cenouras cruas foram congeladas usando PF (-5°C/min) e eletrostaticamente descongeladas, o tonoplasto foi rompido pela formação de cristais de gelo causando um decréscimo do turgor e consequente perda d'água. Mudanças na parede celular não foram observadas. O dano celular de cenouras cruas congeladas em nitrogênio líquido e então descongeladas em água em ebulição foram significativamente atenuadas. Embora o tonoplasto e citoplasma tenham sido rompidos, não se constatou qualquer separação celular.

Diferenças na textura, exudato e composição pécica de talos e folhas de repolhos crus ou branqueados submetidos a congelamento normal ou programado foram avaliadas. O total de substâncias pécticas nos talos foi menor do que nas folhas. As folhas continham mais PB (pectina de baixa metoxilação) do que os talos, mas a quantidade de PA (pectina de alta metoxilação) foi a mesma. O congelamento/descongelamento acelerou a liberação da pectina. Quando os talos foram congelados e então descongelados a 20°C, a separação das células parenquimais ocorreu. O citoplasma das células foi distendido, causando murchamento. Mudanças histológicas nas folhas foram observadas. Folhas cruas têm um tecido esponjoso entre a epiderme. Esses tecidos têm muitos espaços intercelulares e espaços com ar. Esta é, provavelmente, a causa para o exudato nas folhas descongeladas. Quando folhas de repolho foram congeladas e então descongeladas a 20°C, danos nos núcleos e cloroplastos foram observados. O amaciamento dos tecidos e a quantidade de exudato aumentaram quando a velocidade de congelamento foi reduzida. (Fuchigami et al., 1995).

A formação de gelo em escamas vem sendo associada com um decréscimo do conteúdo d'água na base de flores. Tem sido proposto que o movimento d'água para as escamas dos botões de flores no estágio inicial do congelamento, cria uma região seca abaixo da flor que previne a propagação do gelo na flor. A cutícula e a epiderme parecem constituir uma fútil barreira à propagação do gelo. Observou-se ao microscópio eletrônico de varredura a baixa temperatura (LTSEM), a ausência de gelo extracelular nas flores e as células florais não apresentam colapso após o congelamento lento. Além disso, a membrana plasmática não aparece destacada da parede celular para permitir a formação de gelo entre estas. A ausência de espaços intercelulares pode ser crítica para prevenir a propagação do gelo na flor. A água presa em finos poros não congela como porção de água, mas tende a ter um menor ponto de fusão e pressão de vapor, dependendo do tamanho do poro. O tamanho crítico do poro para este efeito ocorrer parece ser de 6nm (Ashworth e Abeles, 1984). O tamanho dos poros da parede celular não foi determinado, mas na ausência de espaços intercelulares, pode estar nesta faixa de tamanho. Células de pequeno tamanho, como vacúolos, e relativamente fina estrutura da parede celular podem aumentar a resistência das células, na base das flores, à deformação da parede celular que resulta do congelamento extracelular. Células de estrutura rígida podem ser críticas ao impedimento do congelamento extracelular e propagação do gelo ao longo da parede celular (Quamme, Su e Veto, 1995).

2.6 Tentativas de estabilização e inibição de cristais de gelo

Sterling (1968), utilizou a imersão de tecidos de maçãs em soluções salinas antes do congelamento em diversas velocidades. Observou diferentes efeitos de proteção devido aos vários

solutos e temperaturas. Verificou que a firmeza em maçãs aumentou em dobro com relação ao tecido *in natura* por imersão deste em soluções salinas a -2°C . Bengtsson e Fernquist (1971) acharam que, para pedaços de morangos da variedade Senga Sengana, o pré-tratamento com uma solução de 20% de glicose sob pressão reduzida, seguido por congelamento a uma velocidade de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ abaixo do ponto de congelamento teve um efeito positivo na perda de exudato e na textura final. Bomben e King (1982), examinaram a morfologia de gelo em maçãs congeladas em função da velocidade de congelamento usando microscopia eletrônica de varredura (SEM - Cold-stage) utilizando teorias de transporte de água celular e solidificação de soluções. As velocidades de congelamento foram alteradas utilizando diferentes meios refrigerantes e diferentes espessuras de isolamento ao redor da amostra. Os autores fizeram uma interpretação quantitativa das observações feitas ao SEM.

Muhr e Blanshard (1986), avaliaram o efeito de polissacarídeos como estabilizadores na velocidade de crescimento de cristais de gelo. Foi utilizada sacarose e pequenas quantidades de outras substâncias, a maioria polissacarídeos (manucol, alginato de sódio, metilcelulose, polivinilpirrolidina e hidroxietiléter). Foi observada uma retardação na velocidade linear de cristalização em soluções de sacarose, sendo a formação de gelo drasticamente retardada e alterada pela presença de uma rede de gel.

Yoon e Lee (1990), estudaram o efeito do sorbitol líquido como crioprotetor em surimi (isoladamente L ou e em combinação com sacarose L-S) e o compararam com o efeito crioprotetor do sorbitol cristalino (C), poliol líquido (P) e amido modificado (MS). Foram avaliadas propriedades como perda d'água e formação de cristais de gelo. Géis preparados com surimi e com um baixo nível de crioprotetor apresentaram uma microestrutura esponjosa com a existência de espaços provocados por cristais de gelo, relativamente grandes. Géis preparados com um alto teor de crioprotetores apresentaram uma malha mais compacta e uniforme com

menores e numerosos espaços provocados pelos cristais de gelo. A adição de 8% de sorbitol resultou em uma maior habilidade para retenção d'água, uma maior força no gel e uma menor formação de cristais de gelo. As diferenças na formação de cristais de gelo em géis preparados com diversos teores de crioprotetores foram quantificadas por análise de imagem (Tabela 5). Um aumento no número de ciclos congelamento/descongelamento, reduz os efeitos de crioprotetores na habilidade formadora de gel.

TABELA 5. Efeito dos níveis de sorbitol cristalino no crescimento de cristais de gelo em surimi extrudado^a

Nível (%)	Ciclos ^b Cong./Descong.	Cristais de gelo ^c		Umidade expressiva (%)
		número	área (mm ²)	
8	0	13	3,51 ± 1,75	1,03 ± 0,02
4	3	21	13,80 ± 15,00	15,10 ± 2,23
6	3	22	10,70 ± 12,40	7,79 ± 1,24
8	3	23	7,55 ± 5,38	5,11 ± 0,45

a Os géis foram preparados com surimi após 1 ciclo cong./descong.

b Número de ciclos congelamento/descongelamento aos quais os géis de surimi foram submetidos

c 1,69 mm² de campo medido

d-f Médias (n=3) com cada coluna sendo significativamente diferente (P<0,05).

Ferrero, Martino e Zaritzky (1993), adicionaram goma xantana a pastas de amido que foram submetidas a congelamento sob diversas velocidades. Observaram que baixas concentrações de goma xantana mantiveram características estruturais muitas vezes utilizando-se baixos teores.

Os sistemas modelo de soluções de polissacarídeos estabilizadores apresentam uma estrutura de malha característica quando congelada que é alterada pela adição de sacarose. Sorvetes estabilizados têm, inicialmente, diâmetro médio de cristais de gelo menores do que

amostras não estabilizadas e também possuem melhor estrutura durante a estocagem a temperaturas flutuantes como estabelecido através do crescimento de cristais de gelo e análises organolépticas.

Caldwell, Goff e Stanley (1992), utilizaram sistemas de soluções-modelo com 20 e 40% de sacarose preparadas na presença de estabilizadores (xantana, locusta, carragena e goma guar) com concentrações variando entre 0 e 0,6%. Soluções de estabilizadores sem sacarose também foram preparadas. As soluções modelo de 20 e 40% de sacarose assumiram uma estrutura semelhante a do gelo sólido quando satisfatoriamente congeladas. Sob condições de congelamento lento, a solução de sacarose a 20% formou grandes aglomerados, sem diferenciação do gelo ou fases sólidas, contudo a solução com 40% de sacarose exibiu uma estrutura de cristais de gelo em uma fase contínua desenvolvida como resultado da crioconcentração. Na solução com 20% de sacarose, a quantidade da fase não congelada resultante da crioconcentração pode não ter sido suficiente para o desenvolvimento da estrutura difásica observada no sistema com 40% de sacarose. As soluções contendo estabilizadores sem sacarose apresentaram uma característica estrutura de malha durante sua preparação (Fig.29). O desenvolvimento da estrutura de malha foi substancial, dado que os estabilizadores estavam presentes a menos do que 0,5%. Nota-se, contudo, que essas malhas não se formam em um sorvete à mesma concentração tendo em vista a presença de muitos outros constituintes. Soluções de polissacarídeos na presença de sacarose resultaram em uma estrutura similar para todas as soluções e na perda de suas características estruturais (Fig.30). A presença de sacarose nas soluções estabilizadoras dominou a estrutura de malha formada. Embora a estrutura de malha dos polissacarídeos tenha sido alterada pela adição de sacarose, os estabilizadores promoveram uma estrutura considerável às soluções de sacarose. A solução com 40% de sacarose, crioconcentrada em nitrogênio líquido, teve uma microestrutura com áreas contendo grandes quantidades de gelo e áreas sem cristais de gelo. O exame de

diferentes velocidades de solidificação de sorvetes revelou grande influência na sua microestrutura. A crioconcentração do soro que rodeia os cristais de gelo em sorvetes apresentou uma estrutura aberta, resultante da sublimação da água sólida presente no soro. A estrutura aberta do soro e as bordas dos cristais de gelo pobremente definidas demonstraram que nem toda água congelável foi congelada e a crioconcentração foi incompleta. No congelamento em placas, os cristais de gelo apareceram pequenos, com $25\mu\text{m}$ de diâmetro aproximadamente, todavia, maiores do que nas amostras congeladas em nitrogênio líquido. As bordas dos cristais foram bem definidas, sugerindo que o soluto teve mais tempo para migrar para a frente congelante. Presume-se que os estabilizadores aumentam a resistência/firmeza do soro não congelado em sorvetes, inibindo assim a mobilidade e reduzindo o grau de recristalização.

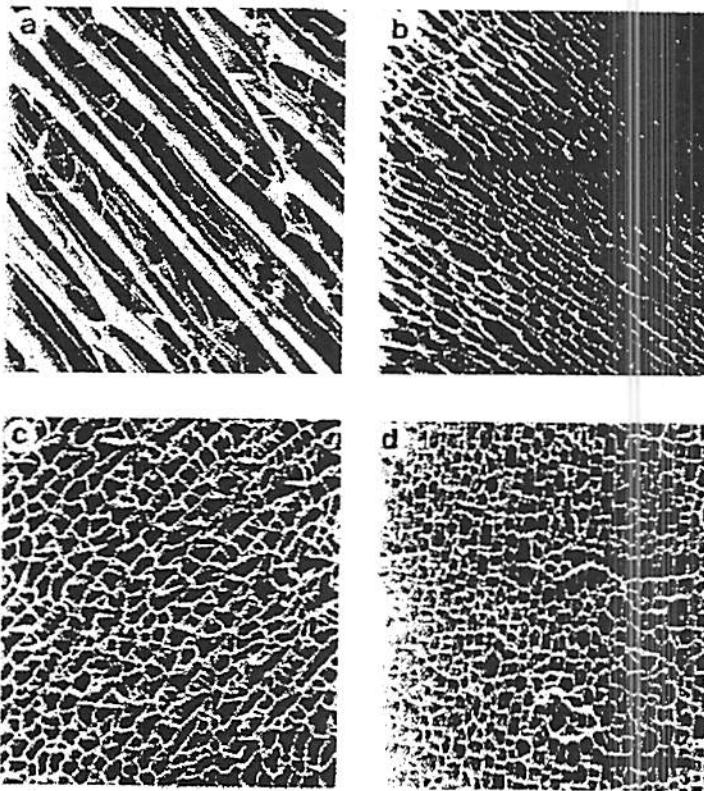


FIGURA 29. Congelamento rápido de soluções com 0,2% de polissacarídeos. (a) goma xantana; (b) goma locusta; (c) carragena e (d) goma guar. Os cristais de gelo se apresentaram paralelo ao plano da fratura em a, inclinado b e perpendicular em c e d. Barra $25\mu\text{m}$ (todas as figuras têm a mesma magnificação). (Caldwell, Goff e Stanley, 1992).

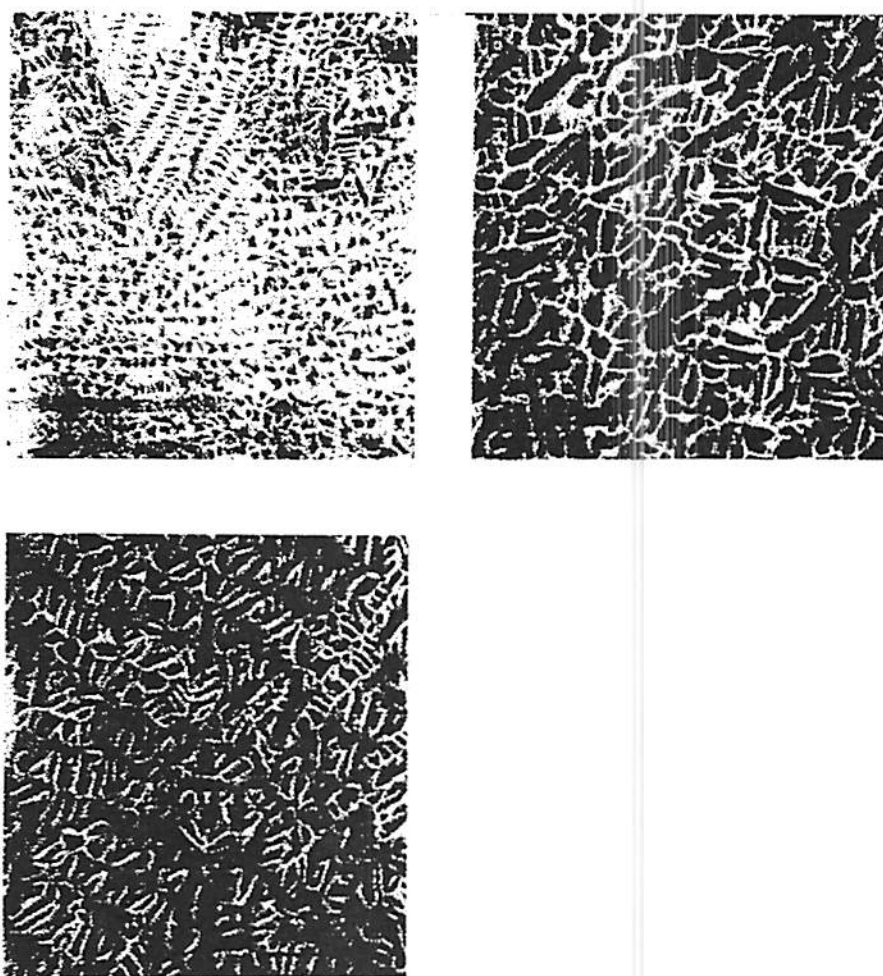


FIGURA 30. Congelamento rápido de soluções com 20% de sacarose na presença de 0,2% de polissacarídeos. (a) goma xantana; (b) goma locusta; (c) goma guar. Barra = 25 μ m (todas as figuras têm a mesma magnificação). (Caldwell, Goff e Stanley, 1992).

Estudos desenvolvidos por Goff, Caldwell e Stanley, (1993), pretenderam descrever o mecanismo pelo qual estabilizadores polissacarídeos contribuem para estabilizar sobremesas lácteas congeladas. Soluções com 20% de sacarose (soluto/soluto) foram preparadas com ou sem a adição de 0,6% de estabilizadores (gelatina, gomas guar, locusta, carragena e xantana). Estes estabilizadores são comumente adicionados em sorvetes para o controle do crescimento de cristais

de gelo durante a solidificação e estocagem, especialmente a temperaturas de transporte abusivas, e para conceder maciez em sua consistência. Os polissacarídeos não apresentaram influência significativa nas propriedades térmicas das soluções de sacarose ou misturas de sorvetes, determinados por Differential Scanning Calorimeter (DSC), contudo, tais substâncias promoveram um efeito protetor no crescimento de cristais de gelo durante a fabricação e estocagem a temperaturas flutuantes. O tamanho inicial e a taxa de crescimento dos cristais de gelo foi reduzida em sorvetes estabilizados. Os estabilizadores promoveram resistência à deformação térmica e aumentaram a viscosidade acima da T_g' mas não influenciaram significativamente a T_g' experimental das soluções. O controle do crescimento dos cristais de gelo em sorvetes estabilizados acima desta T_g' , parece ser uma função das propriedades cinéticas do líquido viscoelástico concentrado pelo congelamento ao redor dos cristais.

Monsalve-González, Barbosa-Cánovas e Cavalieri (1993), observaram correlação negativa entre a textura de maçãs e a difusão de açúcares. Estes autores verificaram que a penetração do açúcar era acompanhada por um amaciamento. Este foi minimizado pela adição de 0,03% de cloreto de cálcio. Paoletti e Menesatti (1993), estudaram o pré-tratamento com cálcio sobre a textura de maçãs submetidas a congelamento. Uma solução com 70°Brix de sacarose e 0,28% de cloreto de cálcio mostrou uma significativa redução no percentual de compressão nos frutos.

Torreggiani (1993) verificou que a osmose como pré-tratamento ao congelamento reduz o colapso estrutural e a perda de exudato durante o descongelamento.

A criopreservação consegue manter células por períodos de tempo extremamente longos sem detectáveis mudanças genéticas ou morfológicas. As células podem sintetizar ou absorver substâncias naturais em resposta ao congelamento. Por exemplo, a redução do seu ponto de

congelamento pela produção de compostos anticongelantes tais como as glicoproteínas em peixes árticos e antárticos, e a trealose ou glicerol encontrados em células fúngicas como resposta ao seu congelamento ou stress osmótico. Tais substâncias têm sido usadas como crioprotetores para reduzir o efeito danoso do congelamento e descongelamento. O glicerol reduz a concentração de sais em equilíbrio com o gelo a uma temperatura abaixo do congelamento, quer no meio ou na célula, impedindo assim a ocorrência de níveis de sal prejudiciais. Polímeros de alto peso molecular tais como polivinilpirrolidina (PVP) não são penetrantes e podem modificar a permeabilidade das células a íons, evitando assim, o excessivo 'stress' osmótico. Crioprotetores, geralmente, reduzem o tamanho dos cristais de gelo e alteram ou reduzem o colapso celular substituindo a ausência d'água (Thomas e Smith, 1994).

O efeito de materiais coexistentes com o gelo tais como sacarose (modificadora da atividade d'água), cloreto de sódio (formador de estrutura) e uréia (rompedora de estrutura) foram examinados por Miyawaki, Abe e Yano (1992). A adição desses materiais a um nível de 5% aumentou substancialmente o tamanho do gelo. A adição de tensoativo (Triton X-100 a 5%), contudo, inibiu consideravelmente o aumento do tamanho do gelo após a adição de sacarose, etc., provavelmente por causa da inibição da taxa de transferência de massa d'água para a interface gelo-líquido.

McCurdy et al. (1994), utilizaram dextrana como um estabilizador de produtos lácteos congelados. Em soluções aquosas a dextrana exibe uma remarcável baixa viscosidade. A adição de dextrana em sorvetes sob agitação resultou em valores muito mais elevados devido ao resultado de interações entre as dextranas, proteínas do leite e outros estabilizadores. A adição de dextrana efetivamente aumentou a T_g do sorvete, o que indica seu potencial como crioprotetor. A dextrana também reduziu significativamente a percepção sensorial de cristais de gelo em amostras de sorvete submetidas a choque térmico. Isto resultou da habilidade da dextrana em reduzir o

crescimento dos cristais de gelo durante a estocagem normal e temperaturas abusivas. Contudo, a dextrana também pode produzir uma firmeza exagerada e características de fusão em sorvetes que podem influenciar a sua aceitabilidade.

Resende (1995), avaliou a influência de hidrocolóides sobre o crescimento de cristais de gelo em tecidos de melões congelados com diferentes velocidades. Os tratamentos com sistemas constituídos de amido gelatinizado e pectina, adicionados de sacarose e íons cálcio, obtiveram melhores resultados na manutenção da estrutura celular, menos perda de líquido e melhor textura do material descongelado. (Resende, 1995, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções-modelo

As soluções-modelo contendo arabinose (INLAB), glicose (LABSYNTH), xilose (DIFCO), piridoxina (MERCK), creatina (MERCK), metionina (MERCK), arginina (MERCK), lisina (MERCK), e suas respectivas concentrações e combinações empregadas neste estudo estão indicadas na Tabela.6. Sua natureza químico-estrutural está mostrada nas Fig.31 e 32.

3.2 Congelamento das soluções

Placas de Petri de 2,5cm de diâmetro e 1,5cm de altura foram utilizadas para o congelamento de soluções em um congelador comercial (Metalfrio, São Paulo-Brasil), podendo este atingir $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$. O resfriamento das amostras foi verificado através de termopares Cu-Constantan (Digitron Instrumentation, Inglaterra) acoplados a um registrador de temperatura (SP25K Dataprinter, Inglaterra), sendo um dos termopares colocado em contato com a amostra e o outro no ambiente do congelador. O experimento foi conduzido em triplicata.

TABELA 6. Substâncias empregadas nas soluções submetidas a congelamento.

Substâncias	Concentrações (%)*				
D-Arabinose	5	10	15	20	30
D-Glicose	5	10	15	20	30
D-Xilose	5	10	15	20	30
Arabinose + Xilose					
2 : 1	10	15	20		
1 : 2	10	15	20		
Arabinose + Xilose + Glicose					
2 : 2 : 1	10	15	20		
Cloridrato de piridoxina (C ₈ H ₁₂ ClNO ₃)	1	5	15		
Creatina monohidratada (C ₄ H ₉ N ₃ O ₂ ·H ₂ O)	1	3	5		
DL-Metionina (CH ₃ SCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH)	1	3	5		
L(+)-Arginina (C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)	1	3	5		
L(+)-Monocloridrato de lisina (C ₆ H ₁₅ ClN ₂ O ₂)	1	3	5		

* g substância/100g d'água

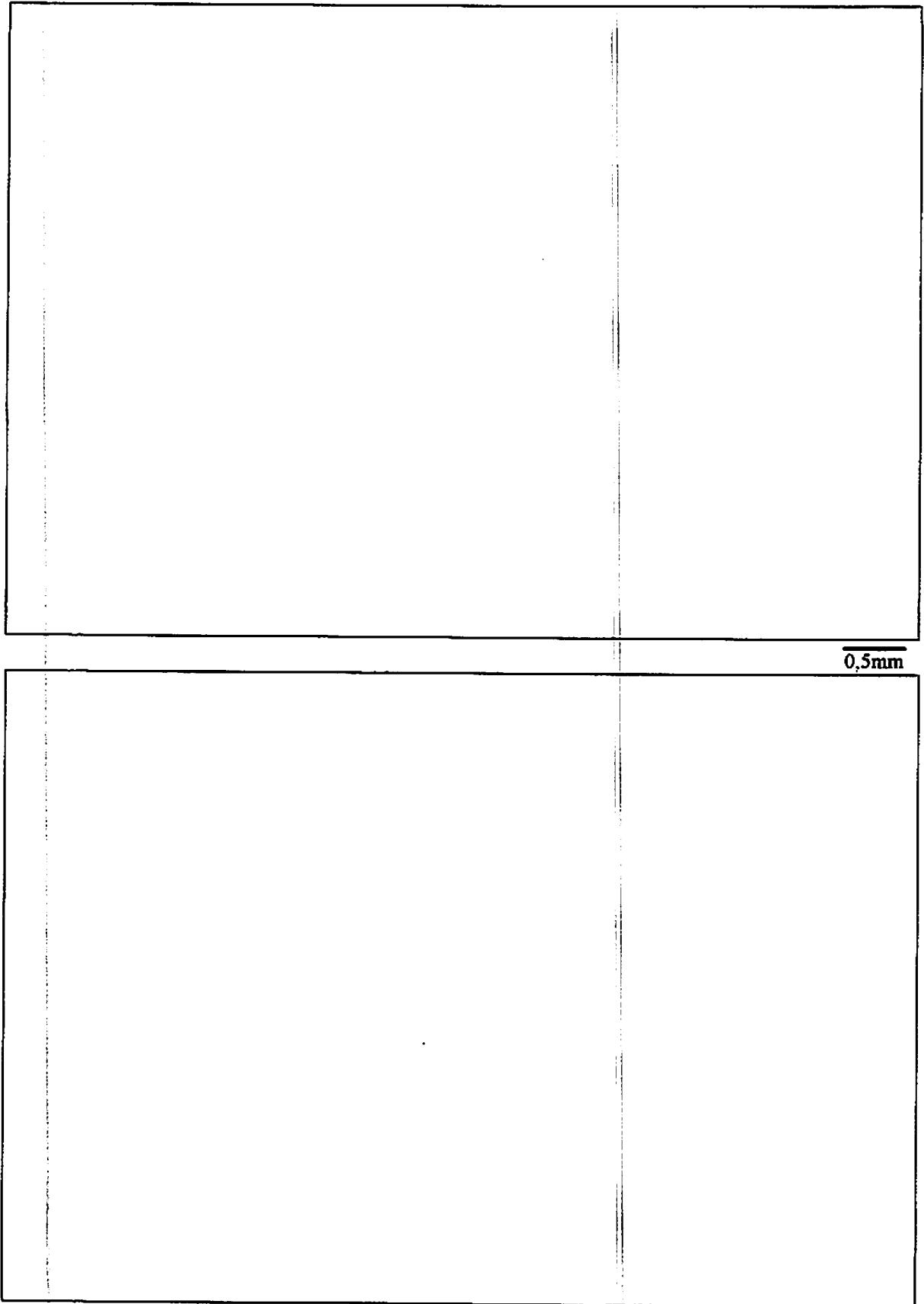
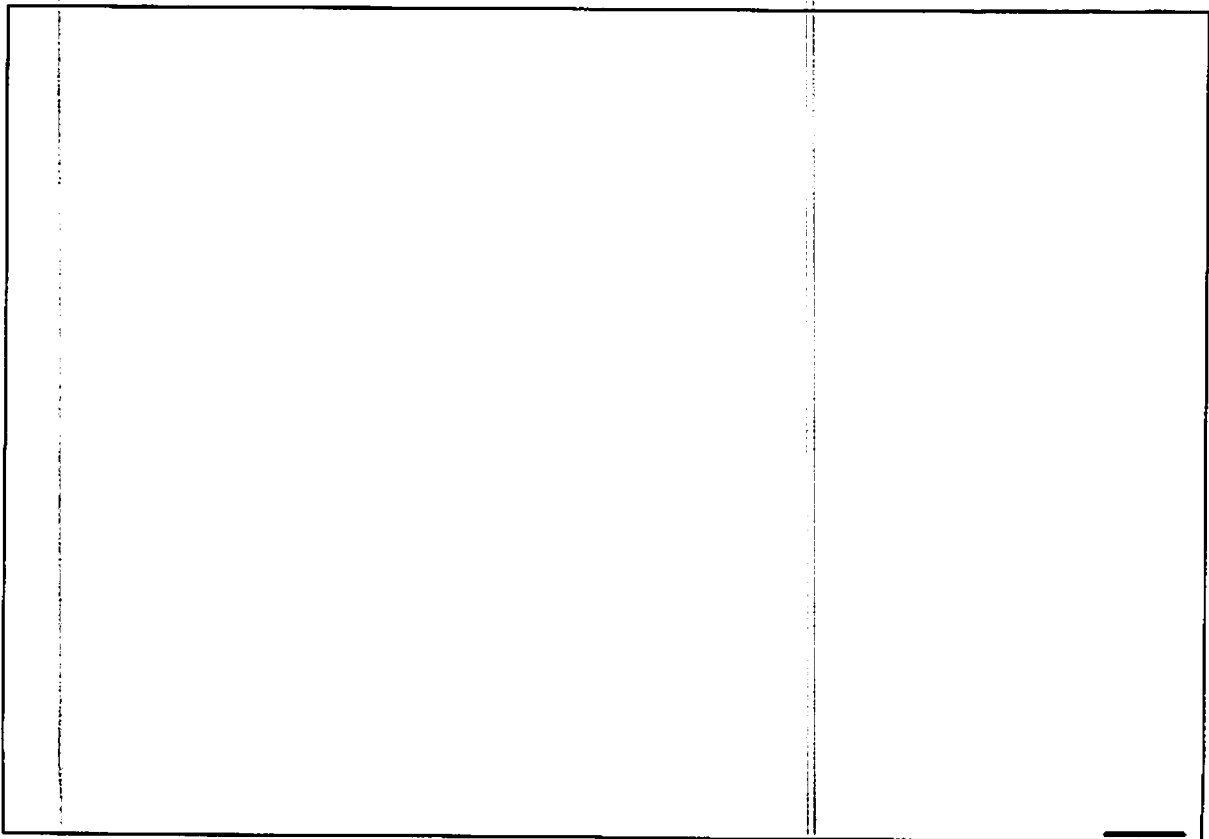


FIGURA 31. Cristais puros de arabinose (A) e xilose (B).

2,5mm



1mm

FIGURA 31, Cont. Cristais puros de glicose, circundados por estruturas um pouco amorfas.

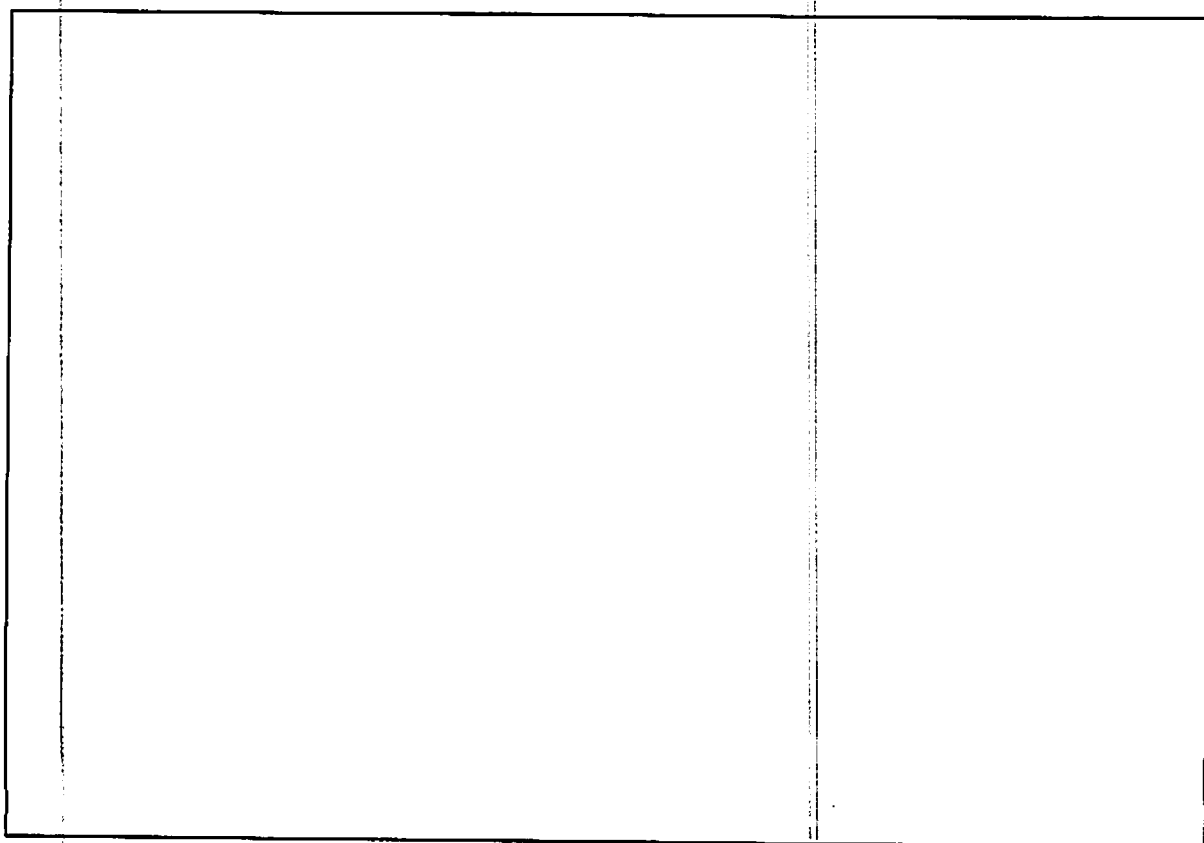


FIGURA 31, Cont. Cristais puros de piridoxina (Vitamina B₆).

—
2.5mm

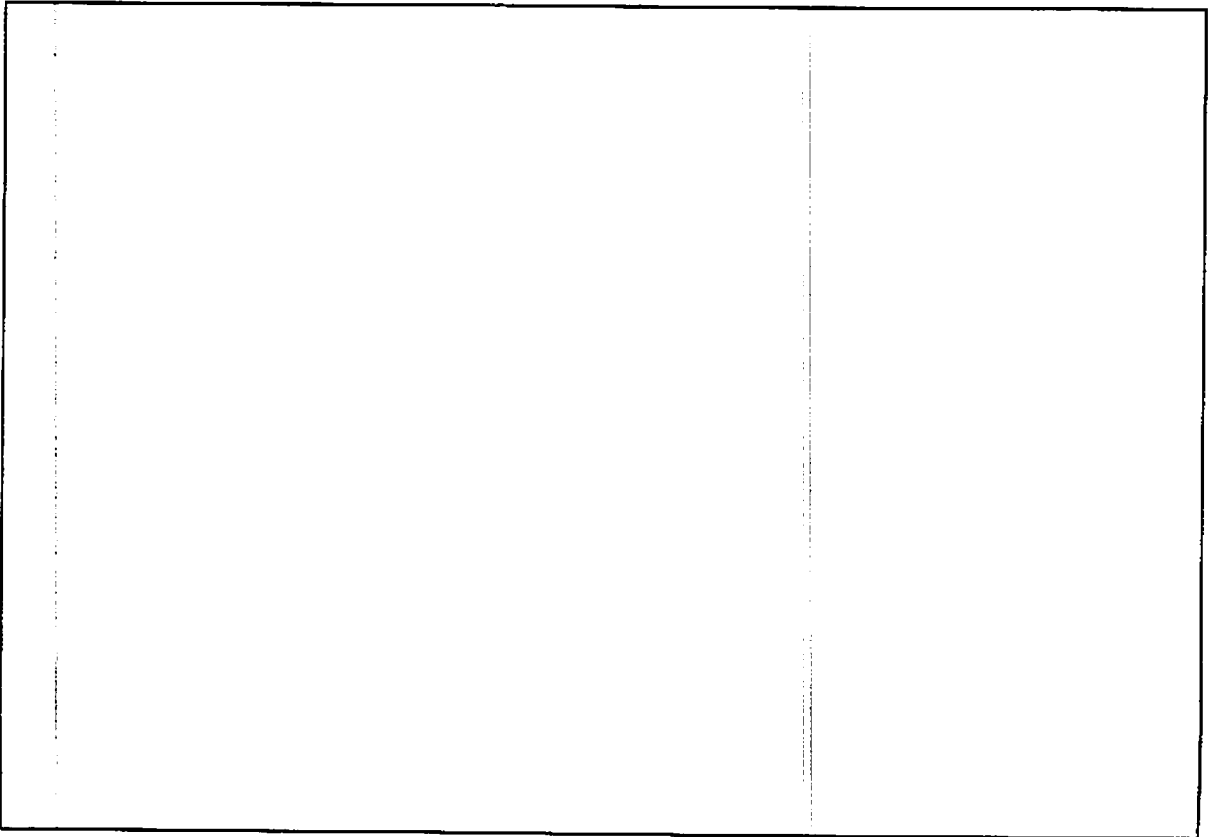
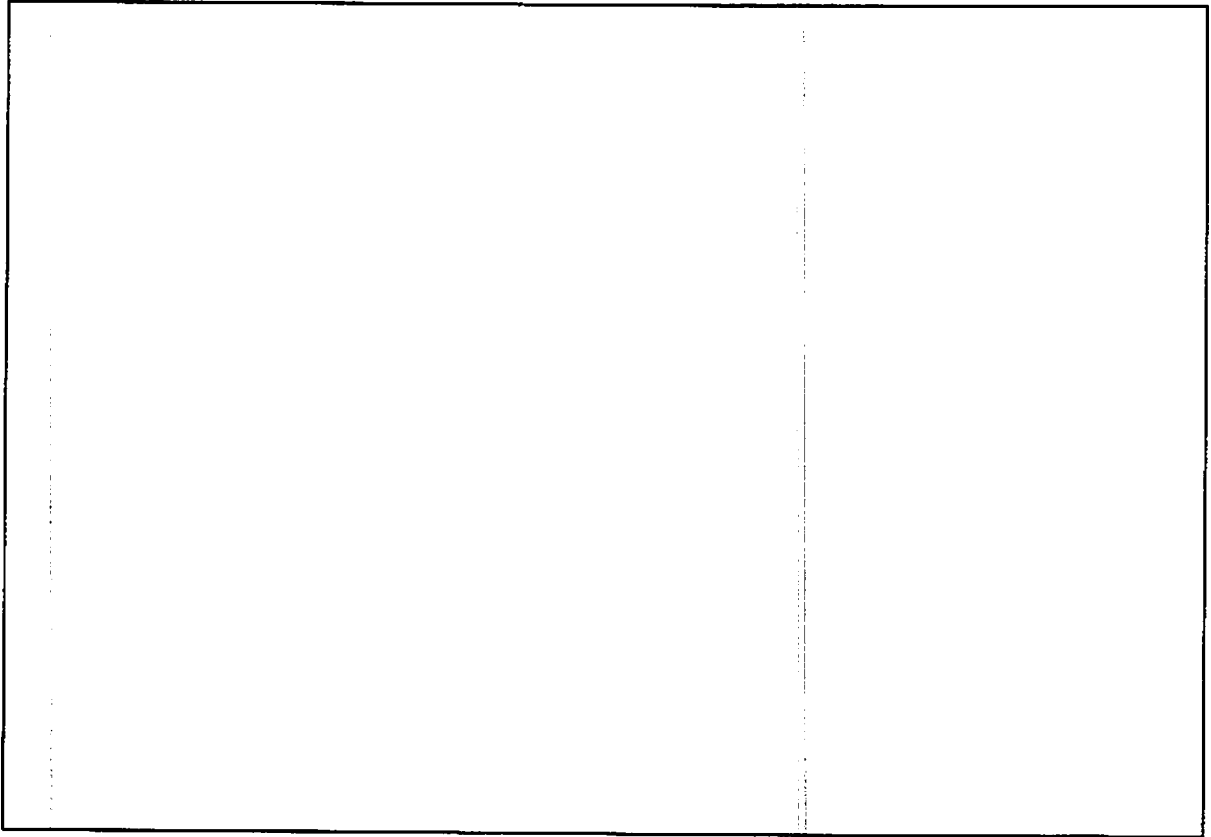


FIGURA 31, Cont. Cristais puros de creatina (E) e metionina (F).

 2.5mm

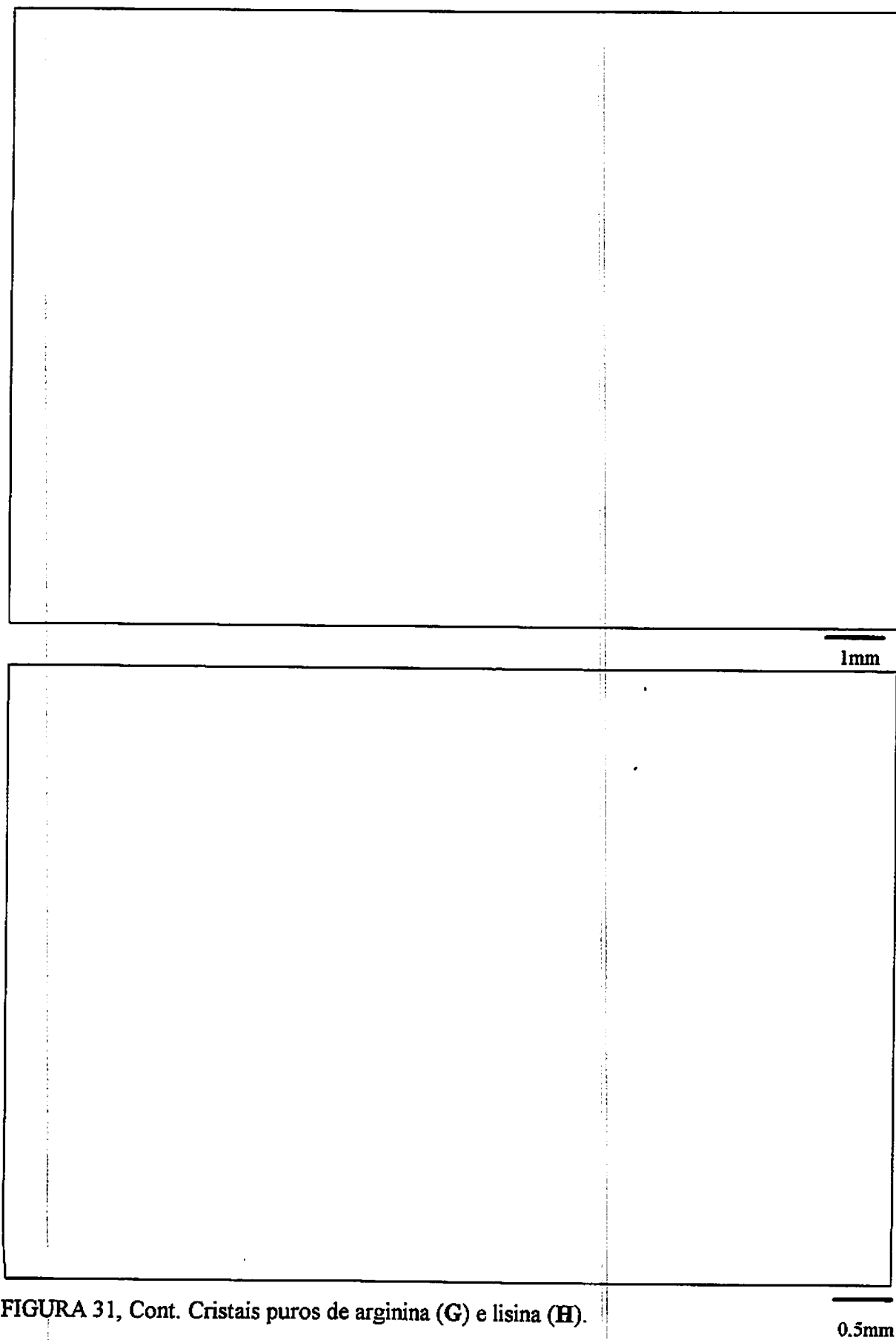
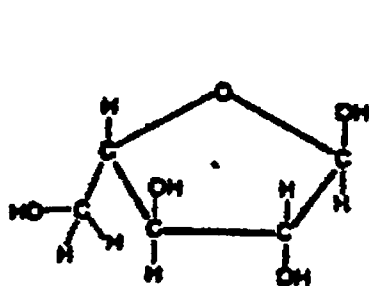
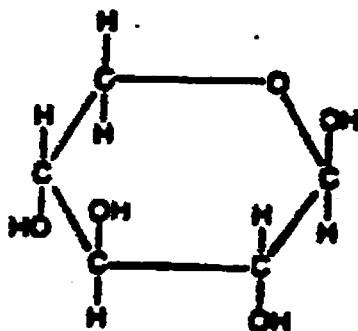


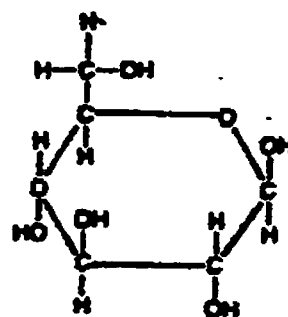
FIGURA 31, Cont. Cristais puros de arginina (G) e lisina (H).



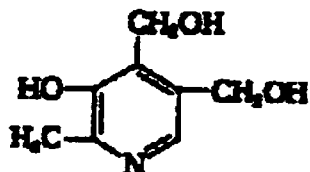
A



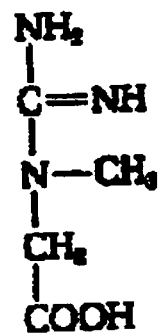
B



C

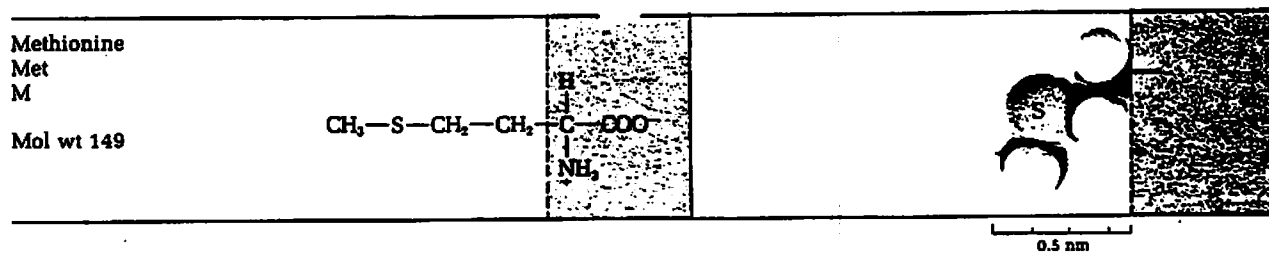


D

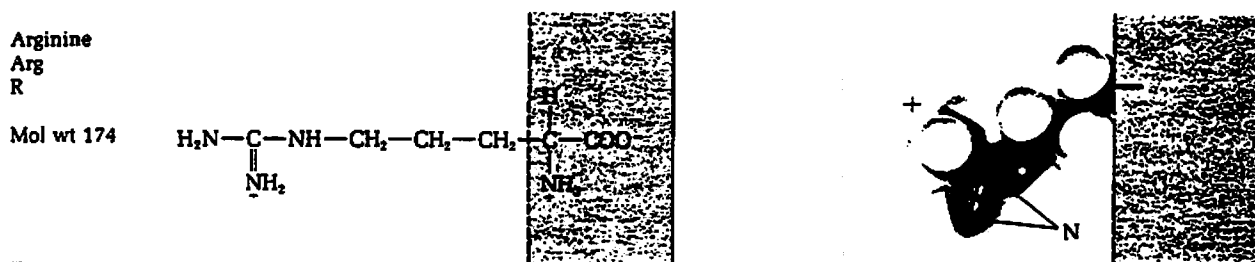


E

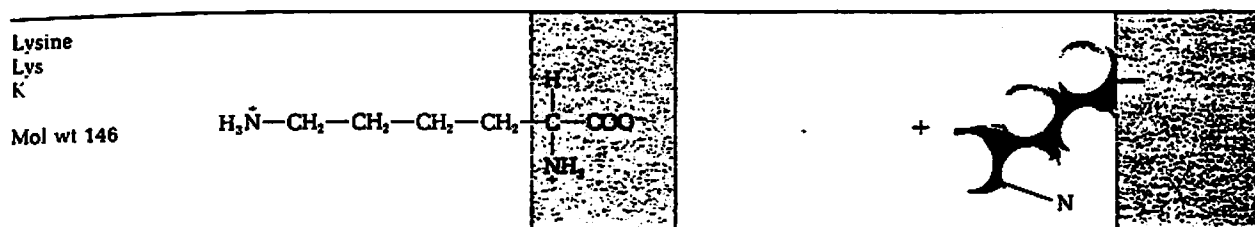
FIGURA 32. Natureza químico-estrutural das substâncias utilizadas nas soluções-modelo que foram submetidas a congelamento. (A) arabinose, (B) xilose, (C) glicose, (D) piridoxina, (E) creatina.



F



G



H

FIGURA 32, Cont. Natureza químico-estrutural das substâncias utilizadas nas soluções-modelo que foram submetidas a congelamento. (F) metionina, (G) arginina e (H) lisina.

3.3 Registro microscópico

As amostras submetidas ao congelamento lento (ar estático) foram observadas ao Microscópio Ótico de Contraste de Fase (Nikon optiphot phase contrast 1.25, Japão), munido de um sistema de câmera automática (Nikon FX-35A, Japão), e um filtro de polarização. As fotos foram produzidas, em sua maioria, com uma magnificação de 4x e copiadas no tamanho de 10x15cm.

O microscópio de contraste de fases é essencialmente um dispositivo que permite acentuar pequenas diferenças do índice de refração e espessura por ventura existentes entre vários componentes celulares ou tissulares, possibilitando o estudo de materiais não corados. Ele possui uma série de dispositivos que permitem transformar as diferenças de fase em diferenças de amplitude ou intensidade para melhor visualização do objeto em estudo. O polarizador orienta as ondas luminosas para um só plano. Quando o objeto sob observação é atravessado pela luz polarizada, com um mesmo índice de refração -não importando qual a direção da polarização da mesma- diz-se que ele é isótropo ou isotrópico. Quando o objeto apresenta uma velocidade de propagação de luz não polarizada considerando a direção do plano incidente, diz-se que ele é anisótropo, anisotrópico ou birrefringente (Beçak e Paulete, 1976).

3.4 Análise e interpretação morfológico-estrutural

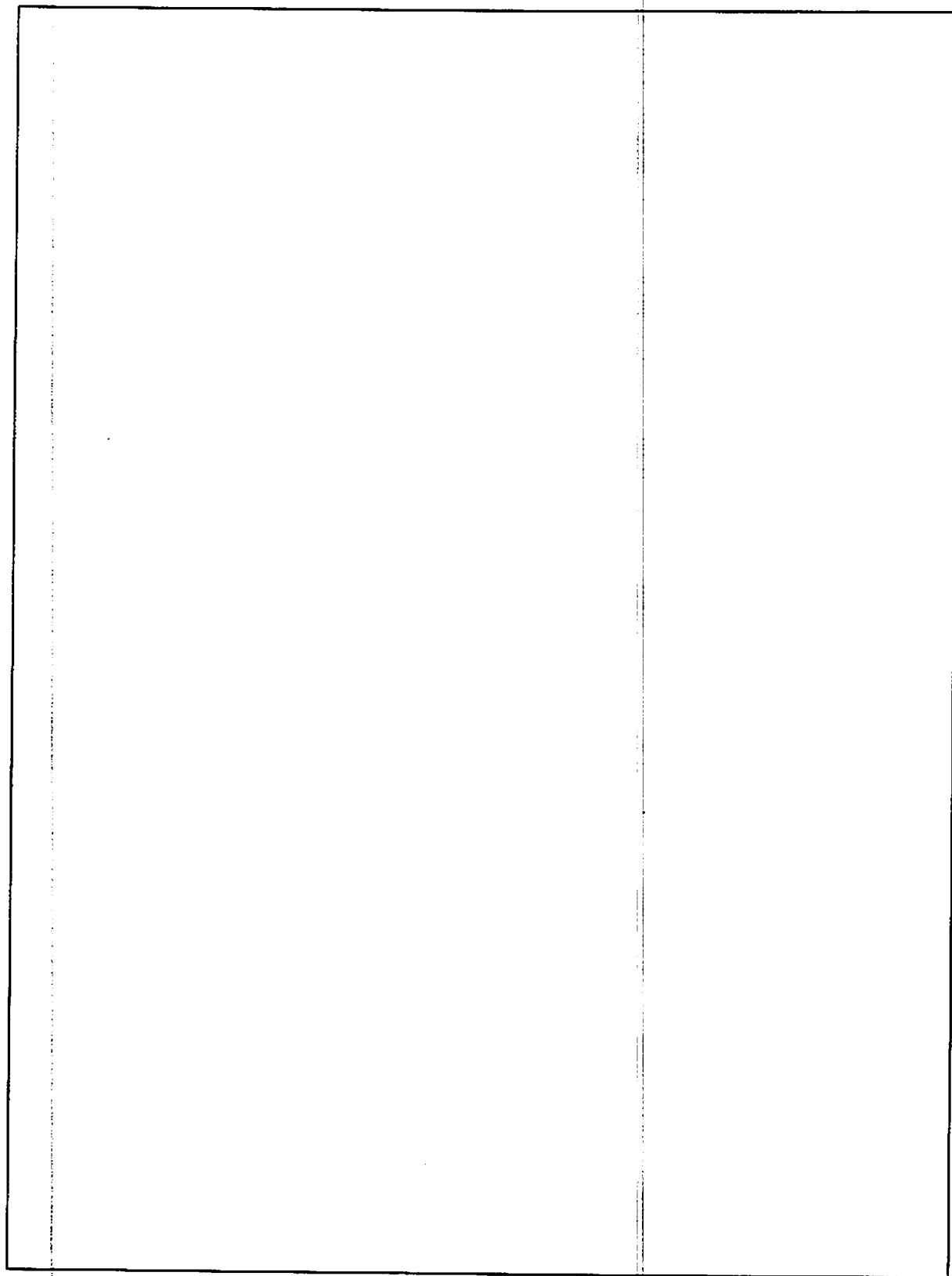
A análise e interpretação morfológica e estrutural foi baseada em dados da literatura e tentativas de enquadramento espacial, considerando as estruturas de gelo formadas e as correspondentes às substâncias empregadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cristais de gelo produzidos em água pura.

Na Fig.33 têm-se cristais de gelo obtidos pelo congelamento de água pura. Pode-se verificar a formação de cristais arredondados. Este crescimento é típico para o congelamento de água destilada (Shirai et al., 1985b, Griffith et al., 1992). Estes apresentaram um raio superficial (crescimento ao longo do eixo *a*, paralelo ao plano da foto) bem maior do que o correspondente ao longo do eixo *c*, perpendicular ao plano da foto. Podem notar-se deformações decorrentes de possíveis perturbações de natureza energética, advindas segundo Muhr (1986) da dissipação do calor latente. Os grandes cristais de gelo obtidos decorrem de uma maior mobilidade das moléculas d'água que ao não encontrarem uma maior oposição ao seu deslocamento sob as condições experimentais, conseguiram uma mais fácil migração para cada núcleo estabelecido. Na ausência de impurezas ou substâncias estranhas tem-se uma nucleação homogênea.

Shirai et al. (1985a), calcularam a relação dos dois raios indicados acima em cristais de gelo numa ampla faixa de subresfriamentos. A razão média em 42 cristais foi de 0,141. Uma morfologia esférica pode ser criticada no campo da velocidade de crescimento anisotrópico, considerando que a anisotropia negligencia a questão da estabilidade que a esfera produz.



2.5mm

FIGURA 33. Formação de cristais de gelo em água pura. ($\Delta T=20^{\circ}\text{C}$).

4.2 Efeito de açúcares sobre a estruturação e morfologia dos cristais de gelo.

A presença de açúcares (arabinose, xilose e glicose) ao nível de 5% (Fig. 34A, 35A e 36A) provocaram a estruturação da água na forma hexagonal. Reconhecidamente os açúcares que ciclizam como hexoses formam estruturas hexagonais em sistemas do tipo estudado. A morfologia dos cristais de gelo pareceu depender da estabilidade da conformação que estes assumiram em cada tratamento. A glicose sendo uma hexose e tendo cinco carbonos ligados com uma hidroxila, permitiu cinco ligações com o gelo conferindo a este uma maior estabilidade conformacional - hexagonal (Fig.36A, 36B e 37). A xilose sendo uma hexose com apenas quatro de seus carbonos ligados com hidroxilas pode ainda promover esta estabilidade (Fig.35A e 38). Já a arabinose, tendo também quatro carbonos ligados a hidroxilas, mas ciclizando como pentose, apresentou uma estrutura um pouco menos definida (Fig.34A e Fig. 39).

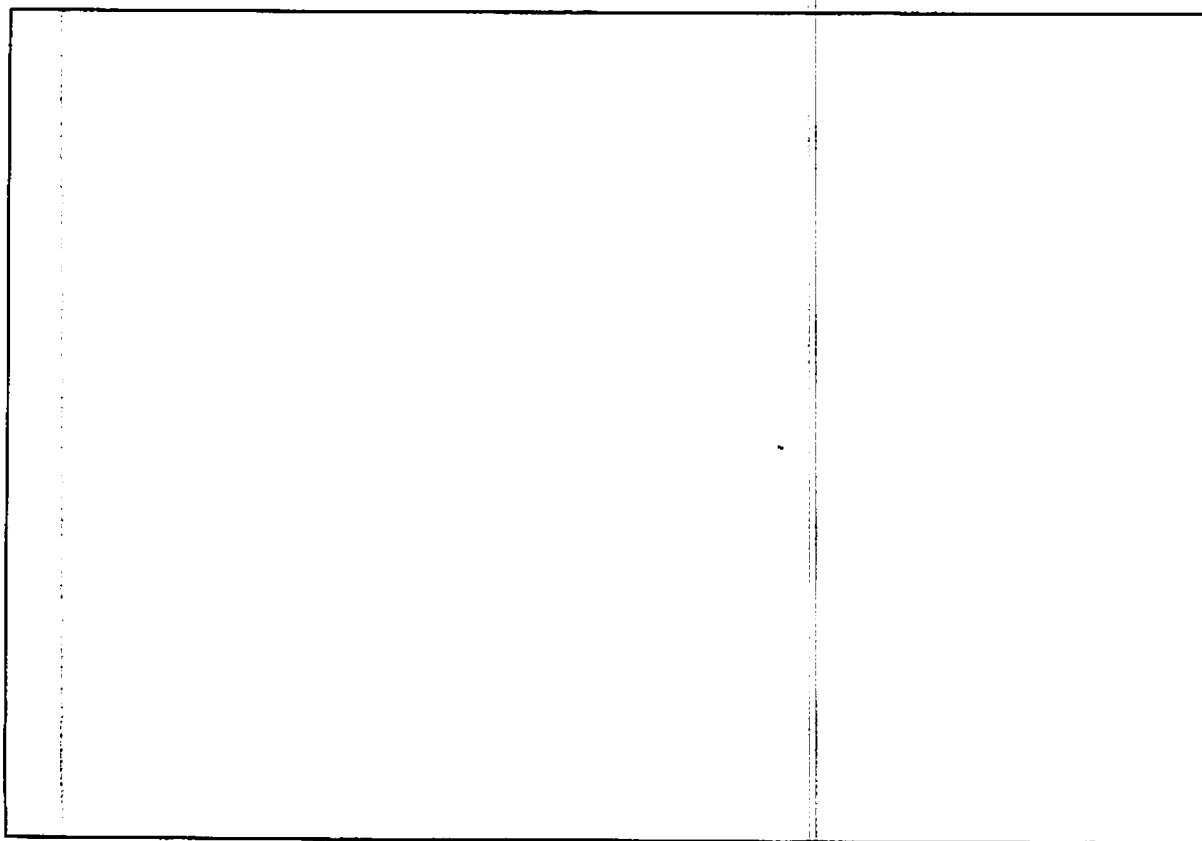
Açúcares são compostos contendo um grupo carboxila (COOH) e muitos grupos hidroxila podendo, devido a isto, ligar-se facilmente à água. As moléculas de polissacarídeos unem-se umas às outras por diversos tipos de ligações glicosídicas (ex., β -1,3 no caso da glicose) e à grade do gelo por pontes de hidrogênio. As substâncias hidrofílicas interagem fortemente com a água por mecanismos do tipo íon-dipolo ou dipolo-dipolo causando mudanças na estrutura e mobilidade da água e mudanças na estrutura e reatividade das substâncias hidrofílicas.

O observado -notadamente nas amostras de arabinose e xilose- deu-se em baixas concentrações do soluto, onde suas moléculas se encontravam presumivelmente mais dispersas e em consequência com mais terminais disponíveis. A uma concentração de 5%, isto foi mais evidente em ambos tratamentos.

O efeito do aumento da concentração do soluto (arabinose, 15-30%; xilose, 10-30%) é mostrado nas Figs 34B, 34D, 34E, 35B, 35C, 35D e 35E. Estes resultados mostram uma

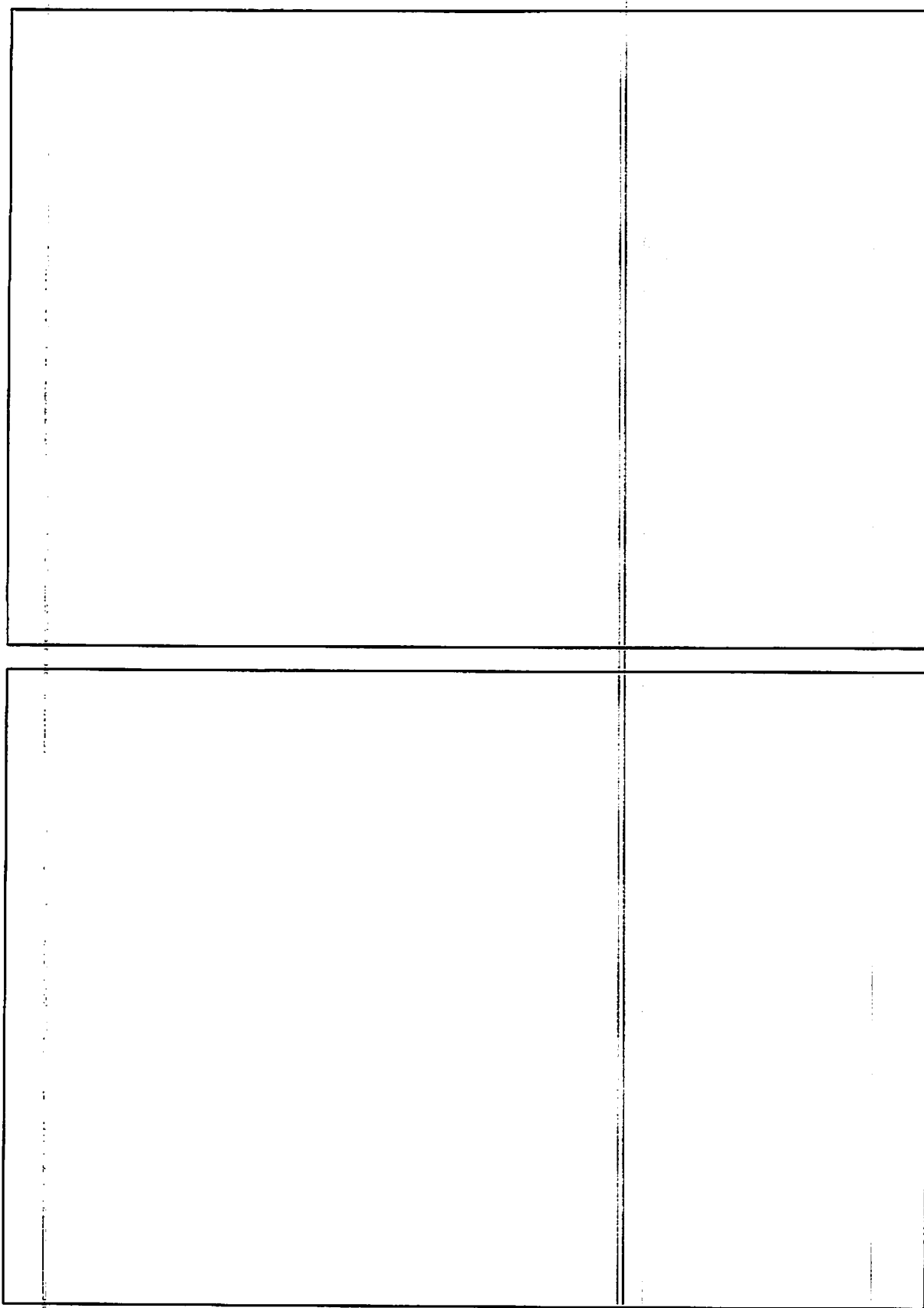
estruturação e morfologia totalmente diversa à apresentada para as amostras contendo 5% de soluto. Uma estrutura do tipo que designaremos como **arbórea**, caracteriza tal efeito. Moléculas d'água parecem ser fisicamente impedidas de migrarem até determinados núcleos para formarem cristais de água e se fixam ao longo das moléculas do soluto. Uma proporção considerável das moléculas d'água, todavia, preencheu os espaços intersticiais da estrutura arbórea, constituídos essencialmente de água pura acomodada coplanarmente. Ratificando o fato das moléculas d'água assumirem nos cristais de gelo a morfologia do açúcar, demonstrou-se tal efeito no tratamento correspondente às soluções contendo 10% de arabinose (Fig.34B), onde pode notar-se a formação de cristais longos e alargados com grande semelhança aos observados para o açúcar cristalino em questão (Fig. 34B). Considerando-se ainda o efeito da concentração dos açúcares na estrutura arbórea, foi observada uma **sobreposição** das ramificações em soluções de xilose nos níveis de 15 e 30% (Fig.35C e 35E). As moléculas d'água não encontrando sítios de ligação nos solutos coplanares, ligam-se a estes em camadas adjacentes ocasionando sua sobreposição. A possibilidade de uma interação a distâncias variáveis das pontes de hidrogênio responsáveis pela consolidação de tais estruturas, não pode deixar de ser enfatizada neste caso.

A estrutura arbórea só foi obtida nas amostras contendo **glicose**, quando a concentração desta nas soluções estudadas atingiu 30% (Fig.36E). Observando os tratamentos contendo glicose nos níveis compreendidos entre 5 e 20% (Fig. 36A, 36B, 36C e 36D), percebe-se uma crescente desestruturação dos cristais de gelo, com uma morfologia altamente ordenada a 5%, forma hexagonal, (Fig.36A) e formas em processo de reestruturação a 15 e 20% (Fig.36C, e 36D). Presume-se que entre os níveis de 20 e 30% (Fig.36D e 36E) tem-se um novo e radical arranjo das moléculas d'água diante das pertencentes à glicose, culminando com a conformação arbórea muito bem definida no tratamento de 30%.



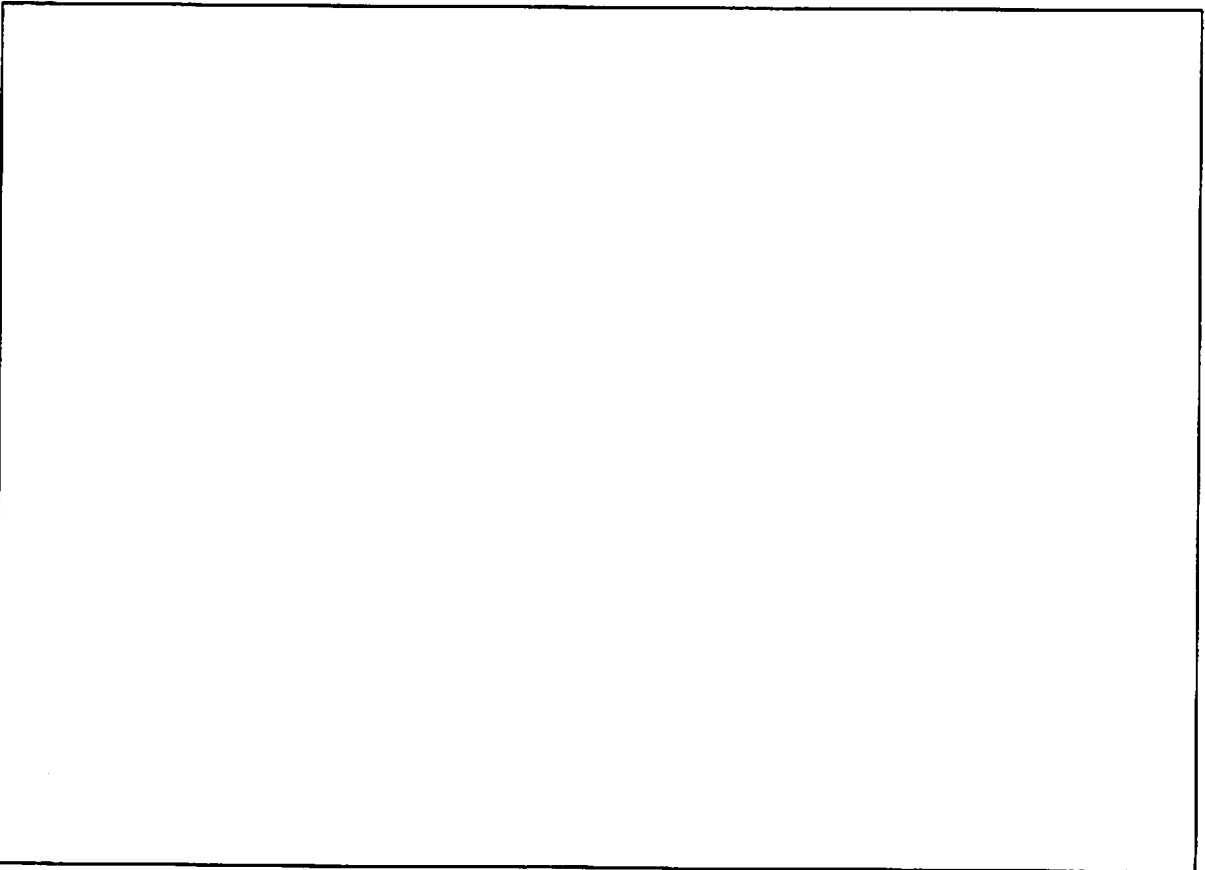
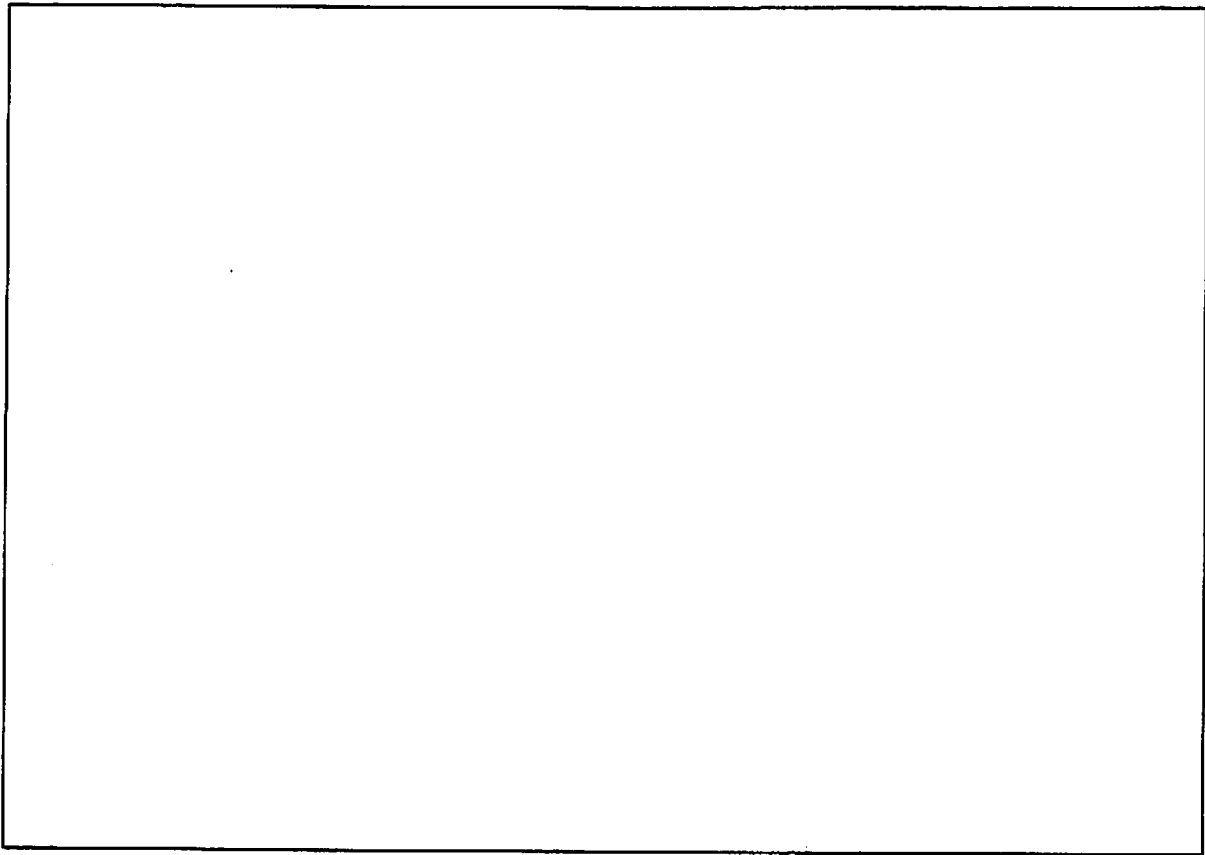
2.5mm

FIGURA 34. Formação de cristais de gelo em solução aquosa contendo arabinose (5%).



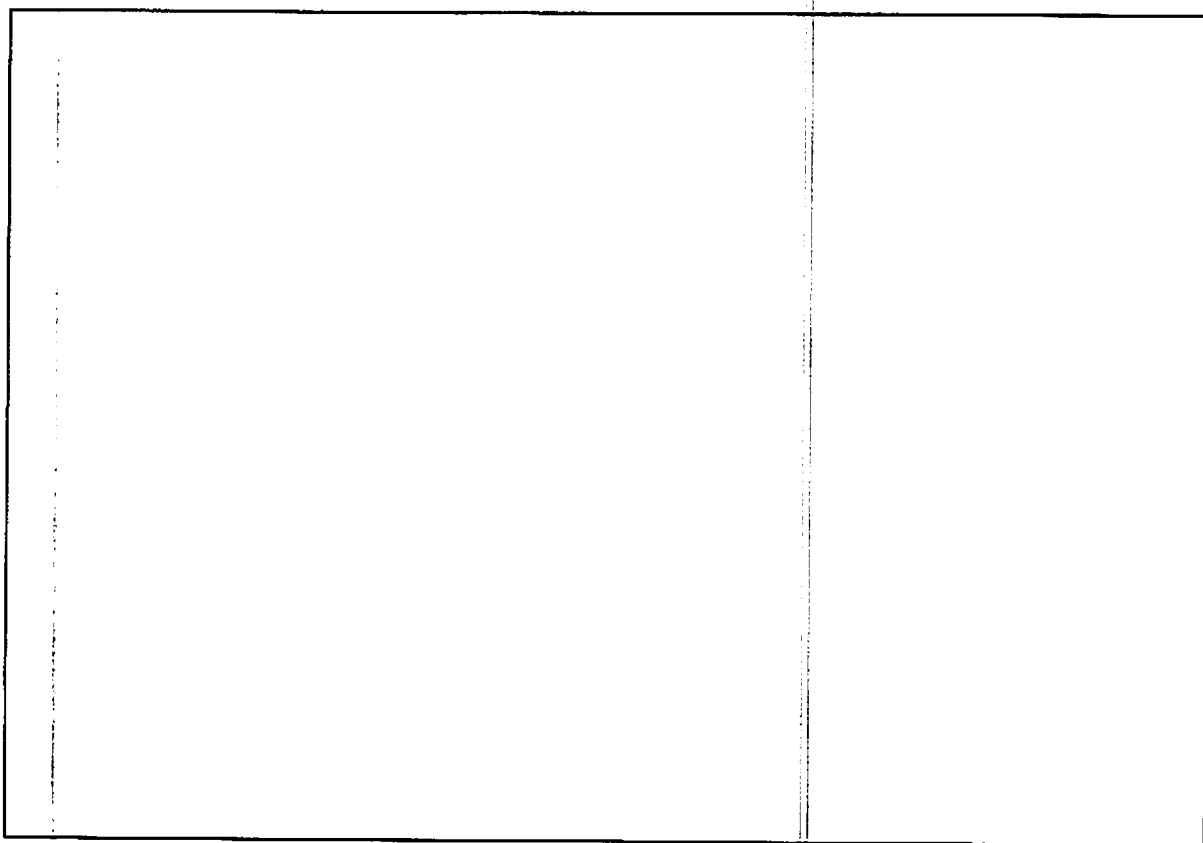
2,5mm

FIGURA 34, Cont. Cristais de gelo em soluções aquosas contendo arabinose 10% (B) e 15% (C).
Seta aponta cristal de arabinose.



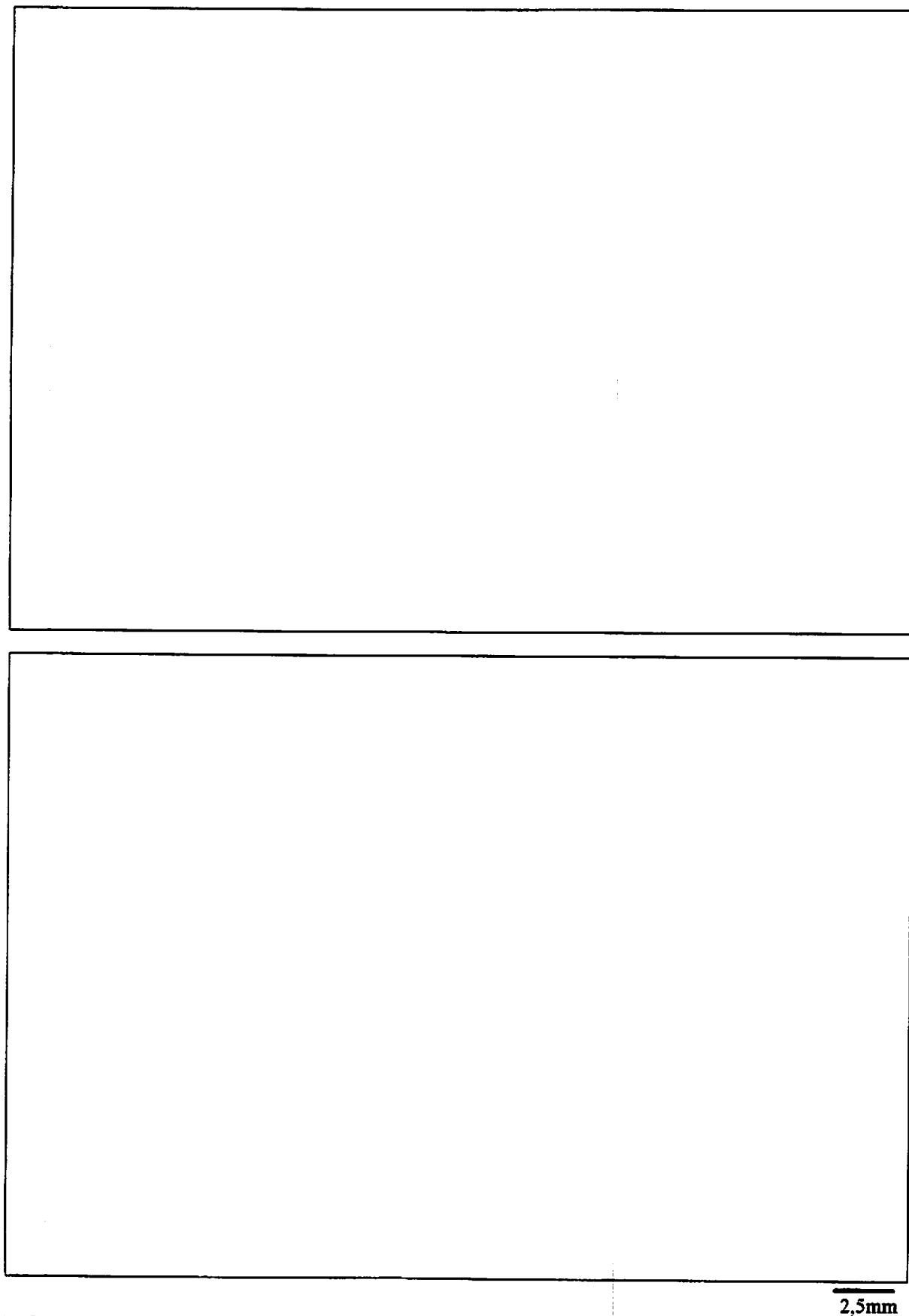
2,5mm

FIGURA 34. Cont. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo arabinose 20% (D) e 30% (E). Seta aponta o centro dos eixos radiais.



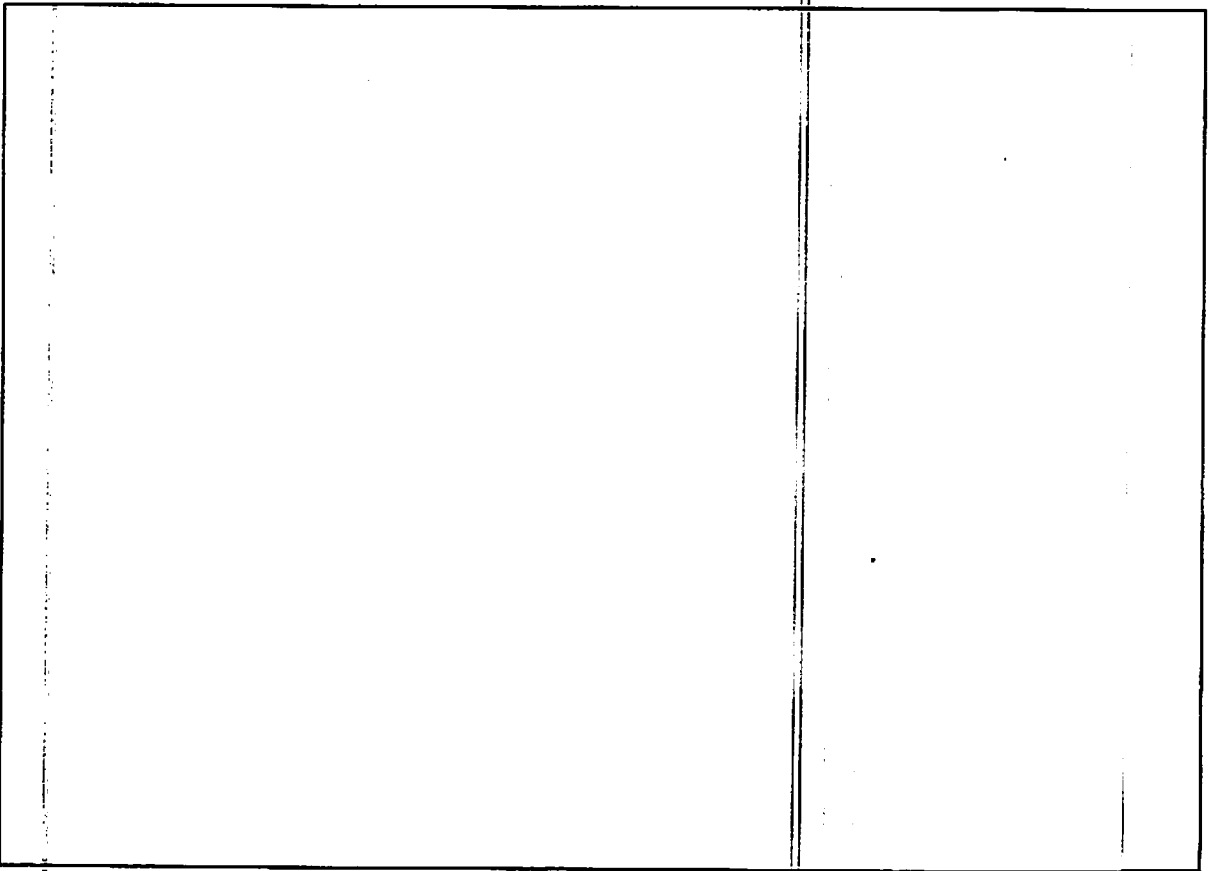
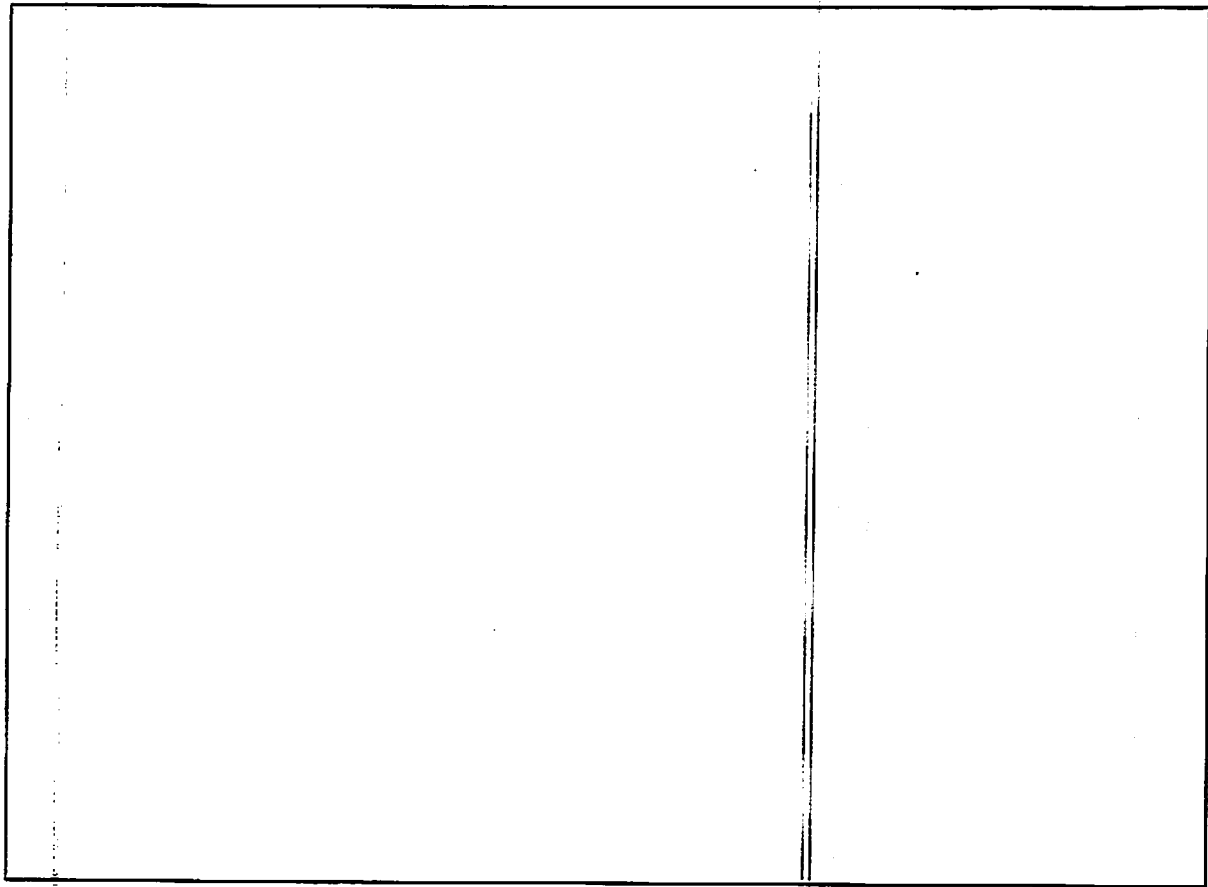
2,5mm

FIGURA 35. Formação de cristais de gelo em solução aquosa contendo xilose (5%).



2,5mm

FIGURA 35. Cont. Morfologia de cristais de gelo em soluções aquosas contendo xilose 10% (B) e 15% (C). Tem-se formações alternadas no primeiro caso e sobrepostas no segundo.



2,5mm

FIGURA 35. Cont. Morfologia de cristais de gelo em soluções aquosas contendo xilose 20% (D) e 30% (E).

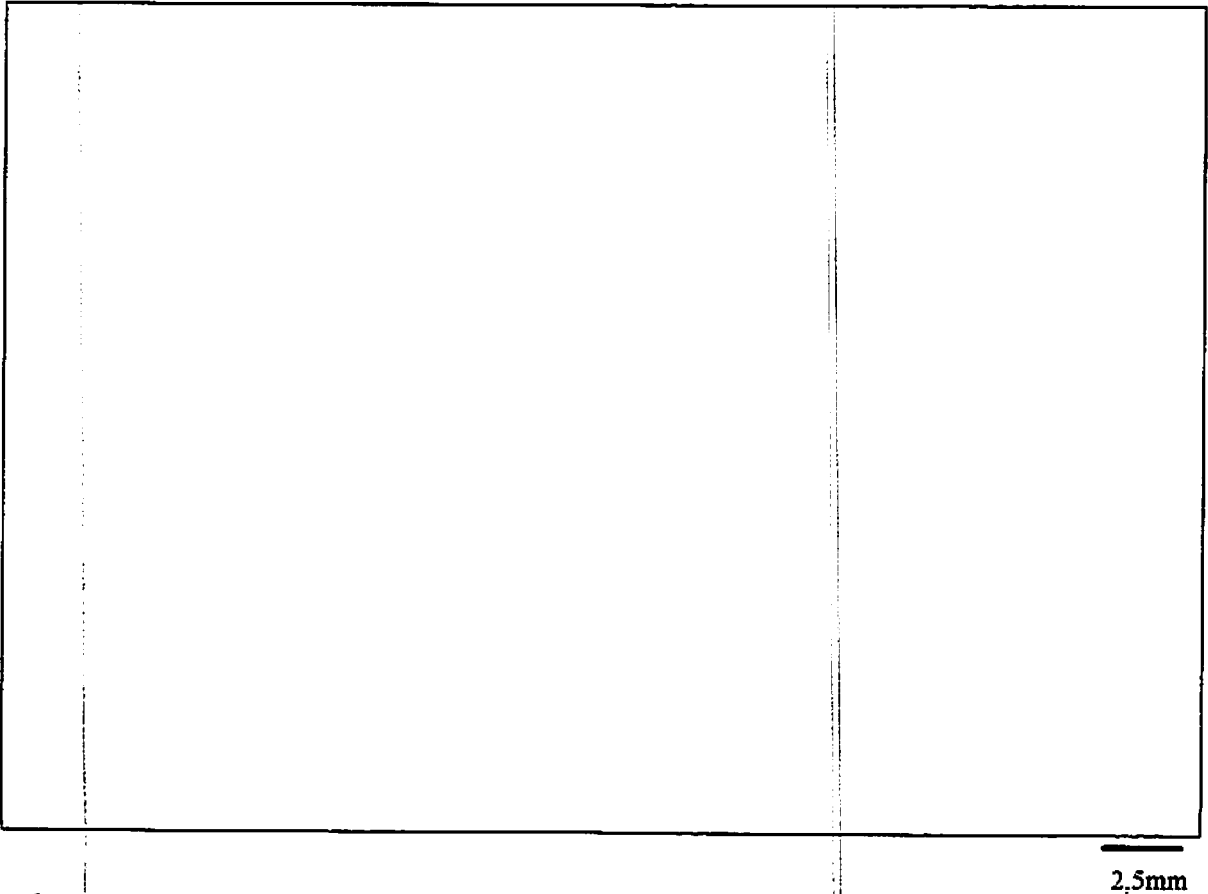
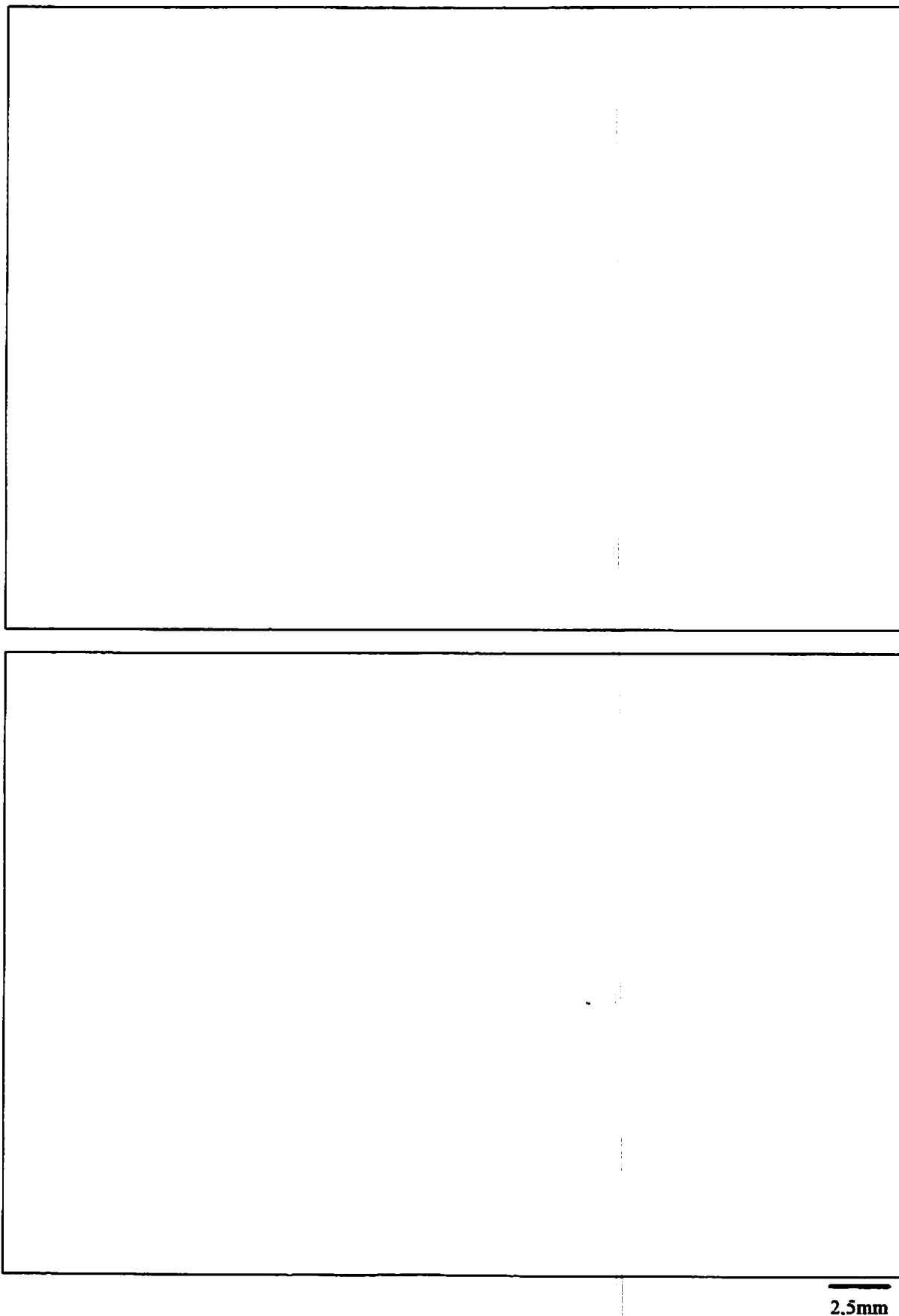


FIGURA 36. Formação de cristais de gelo em solução aquosa contendo glicose (5%).



2.5mm

FIGURA 36, Cont. Arranjos morfológicos de cristais de gelo em soluções aquosas contendo glicose 10% (B) e 15% (C). Note-se a deformação do padrão assumido nas concentrações de 5 e 10%.

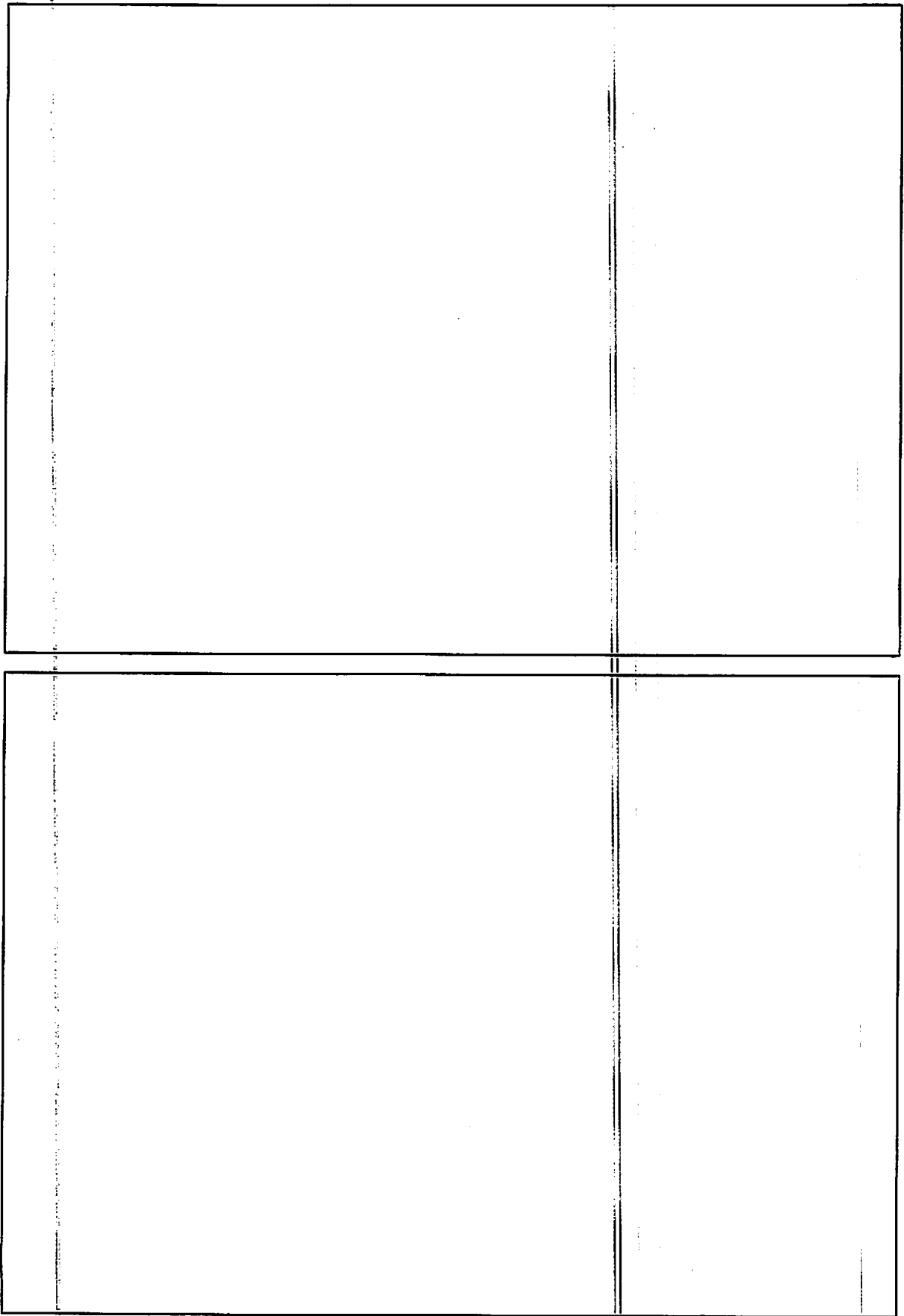


FIGURA 36. Cont. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo glicose 20% (D) e 30% (E).

2.5mm

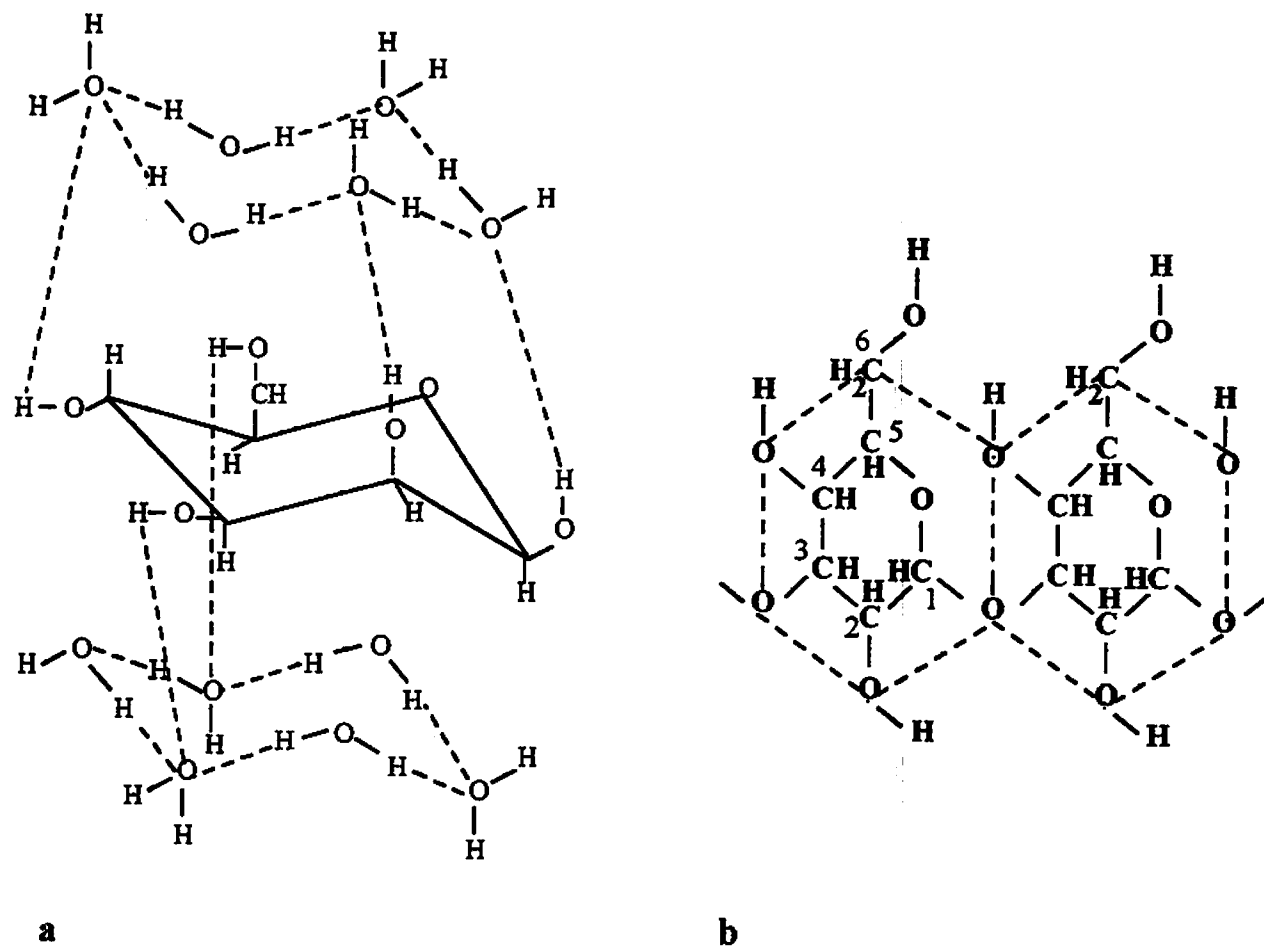


FIGURA 37. Ligações da glicose com a grade do gelo. Molécula de glicose entre duas camadas d'água adjacentes (a). Conformação da superfície do gelo hexagonal ligado a moléculas de glicose (b). ----, ligações com o gelo na camada adjacente. Adaptado dos modelos para scyllo-inositol e β -1,3-poliglucano, respectivamente, concebidos por Warner (1962). (Citado por Warner, 1981).

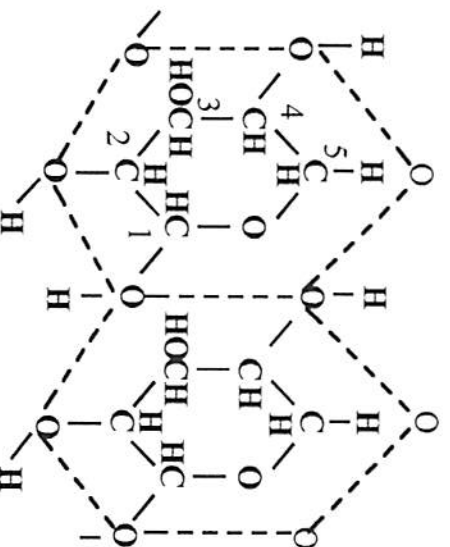


FIGURA 38. Adaptação do modelo para β -1,3-poliglucano de Warner (1962) para moléculas de xilose. ----, ligações com o gelo na camada adjacente.

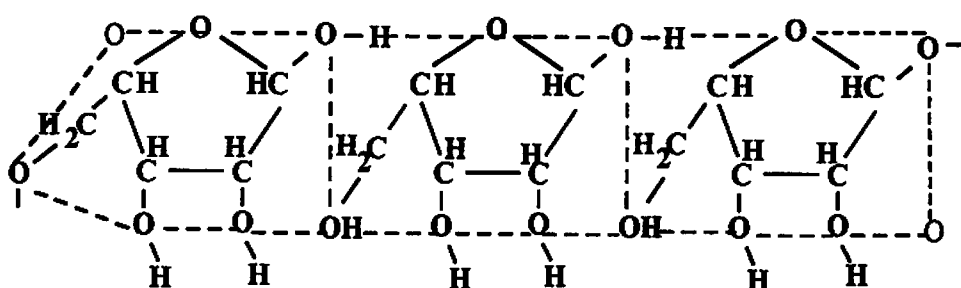


FIGURA 39. Adaptação do modelo para β -1,3-poliglucano de Warner (1962) para moléculas de arabinose. ----, ligações com o gelo na camada adjacente.

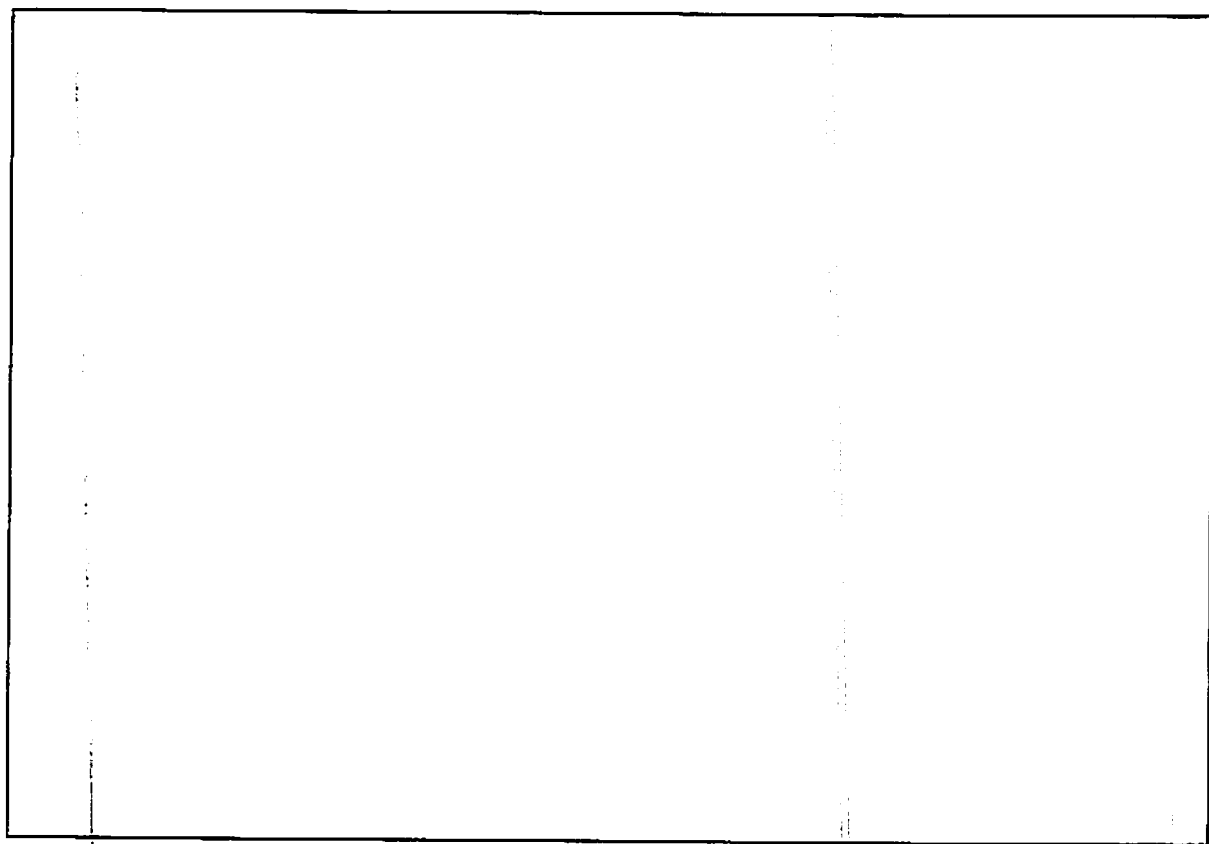
Nas **Fig.40, 41 e 42** são apresentadas, nesta ordem, estruturas arbóreas decorrentes das seguintes **combinações**: arabinose, 2: xilose, 1; arabinose, 1: xilose, 2 e arabinose, 2: xilose, 2: glicose, 1. É notável a incidência de cristais mais **alargados e retos** compondo as ramificações das estruturas de gelo que resultaram da combinação **arabinose, 2: xilose, 1**. Na **Fig.41A**, que corresponde a 15% da combinação arabinose, 1: xilose, 2 pode observar-se ainda a existência de cristais de água pura em processo de estruturação arbórea. O eixo central da configuração já aparece constituído sem contar todavia com as ramificações. O observado parece ser devido a um efeito de concentração e mobilidade molecular, cujos mecanismos devem merecer estudos mais aprofundados.

A combinação de três solutos: **arabinose, 2: xilose, 2: glicose, 1** (**Fig.42**) mostra o resultado de uma estrutura intermediária, produto da competição dos açúcares pela estruturação das moléculas do gelo, as quais tendem a assumir uma configuração semi-retangular, graças à possível **predominância química** da glicose frente aos demais açúcares.

Na **Fig.43** é mostrado um **núcleo de formações arbóreas** resultante da estruturação de cristais de gelo em soluções de glicose 30%. As **Fig.44A e 44B** mostram a estruturação de cristais de gelo em soluções compostas 20% contendo arabinose e xilose, em **detalhe**. Neste caso são facilmente visíveis as **interseções** das ramificações com o eixo principal da estrutura arbórea (**Fig.44A**) e a **sobreposição** destas estruturas (**Fig.44B**).

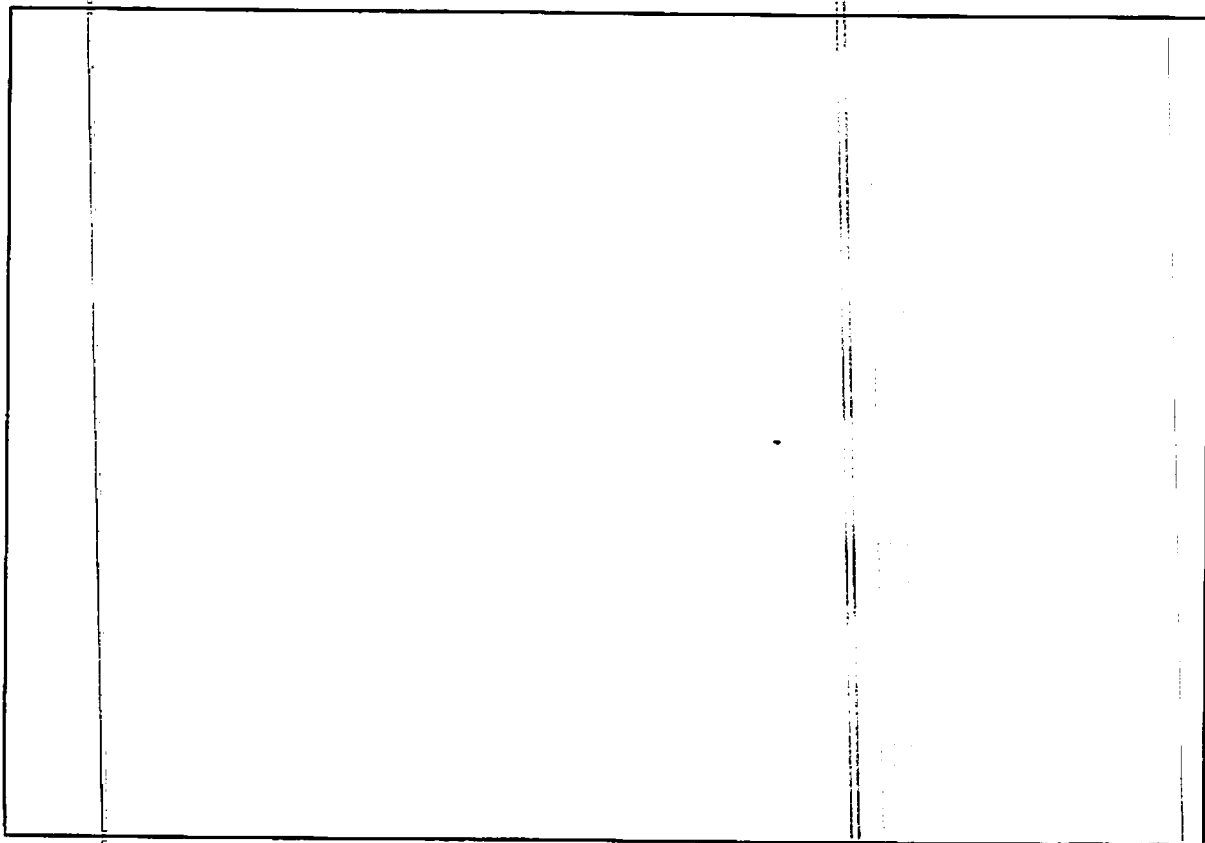
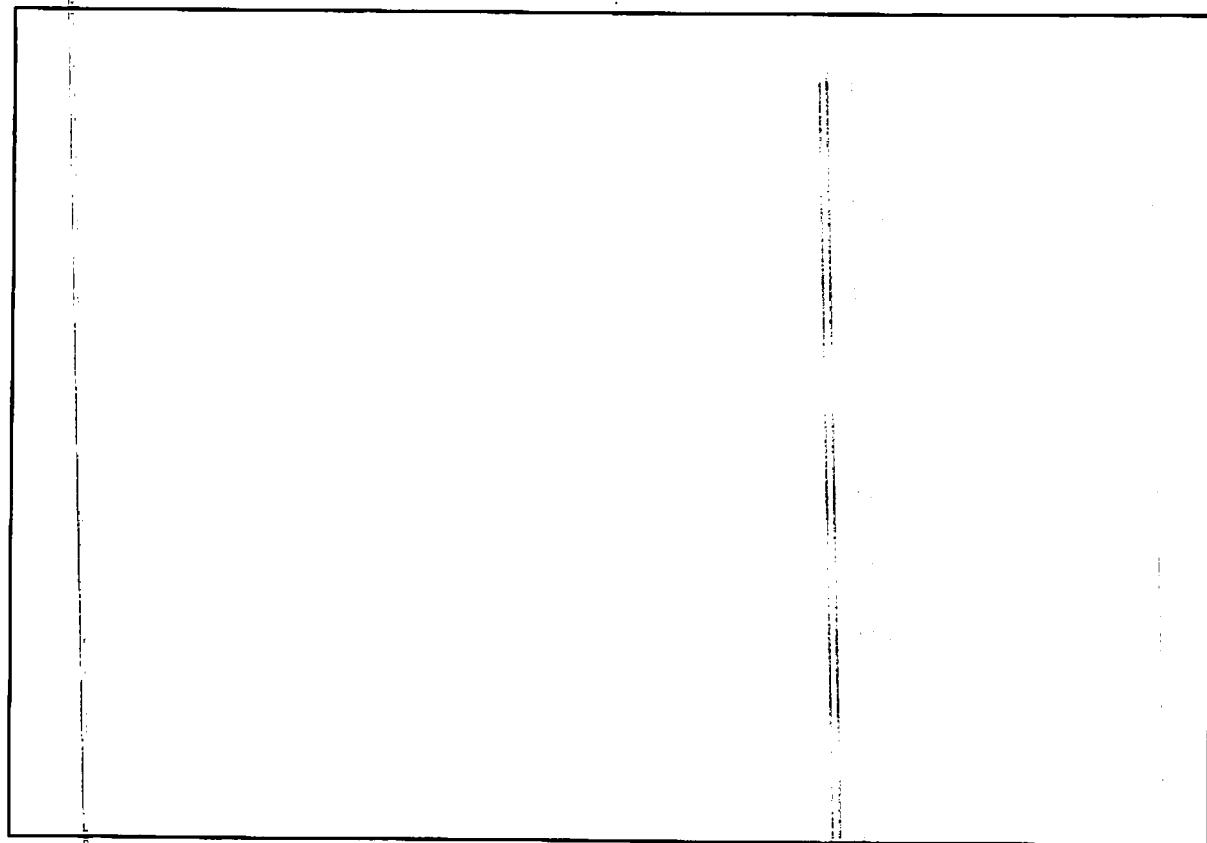
Substâncias cristalinas, como os açúcares, foram nucleantes muito efetivos e a uma maior concentração passaram a estruturar o gelo de modo a reduzir a energia livre do sistema.

De uma forma geral, a nucleação dos cristais de gelo se deu possivelmente de forma heterogênea, em virtude da presença de partículas sólidas na solução. Comumente essas partículas sólidas são substâncias insolúveis em água e seu tamanho, topografia e característica molecular determinam o caráter da formação de gelo (Hallet, 1968, Quervain, 1975 e Rey, 1975).



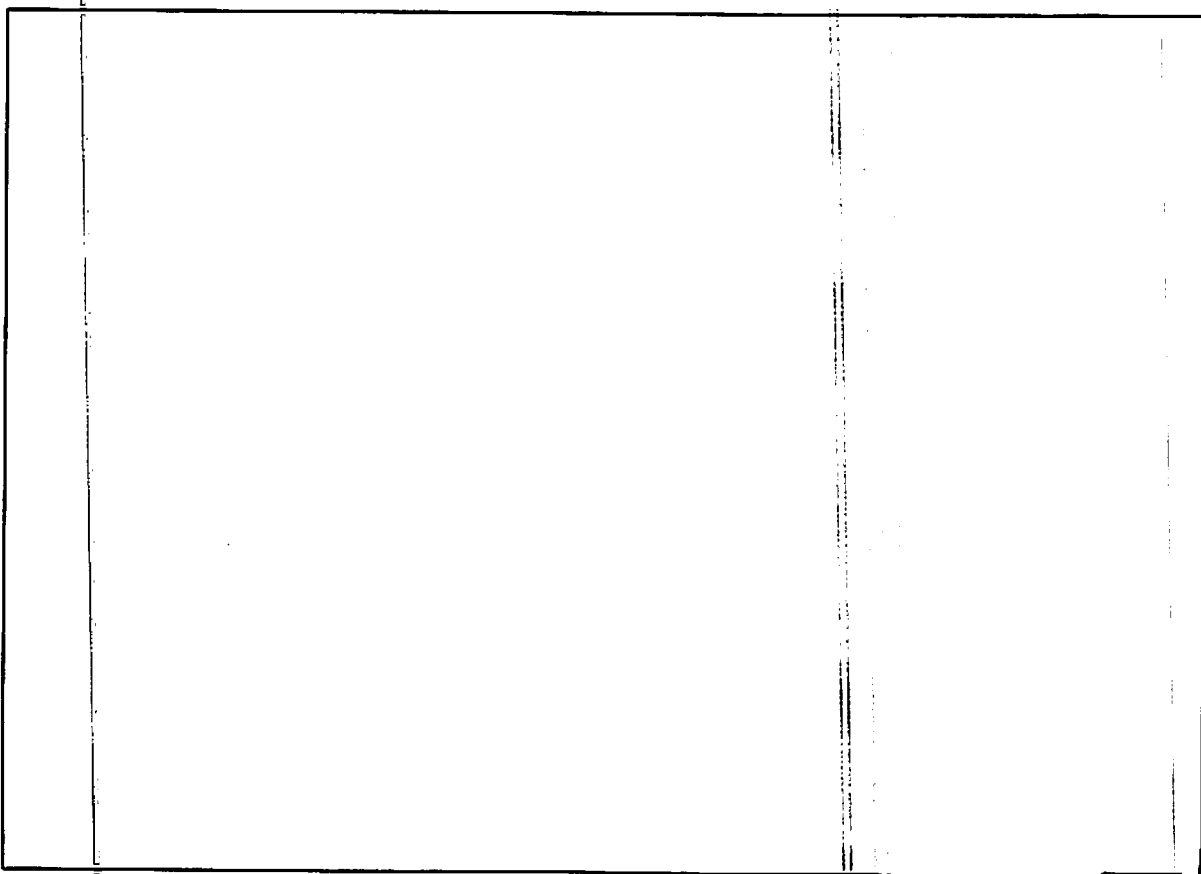
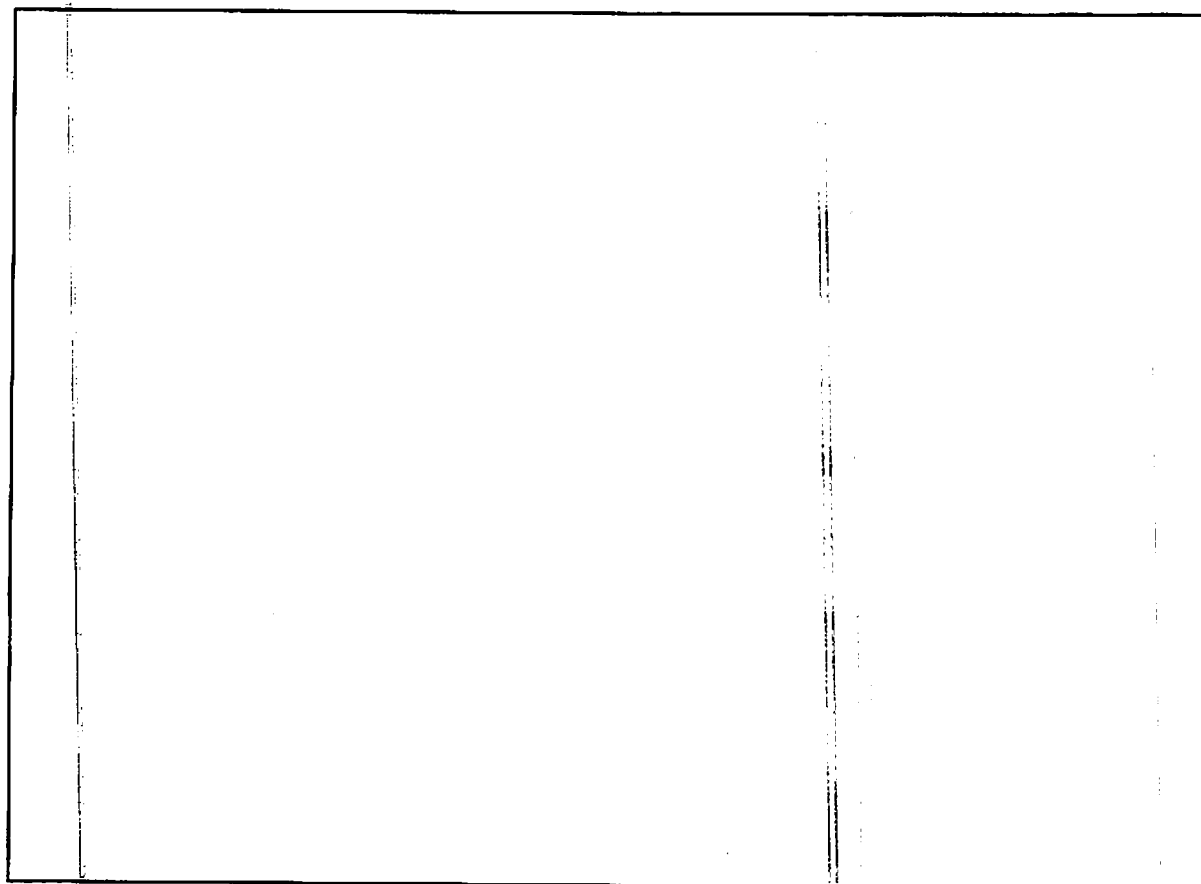
2,5mm

FIGURA 40. Morfologia de cristais de gelo obtida em solução aquosa composta, 10% (arabinose, 2 : xilose, 1).



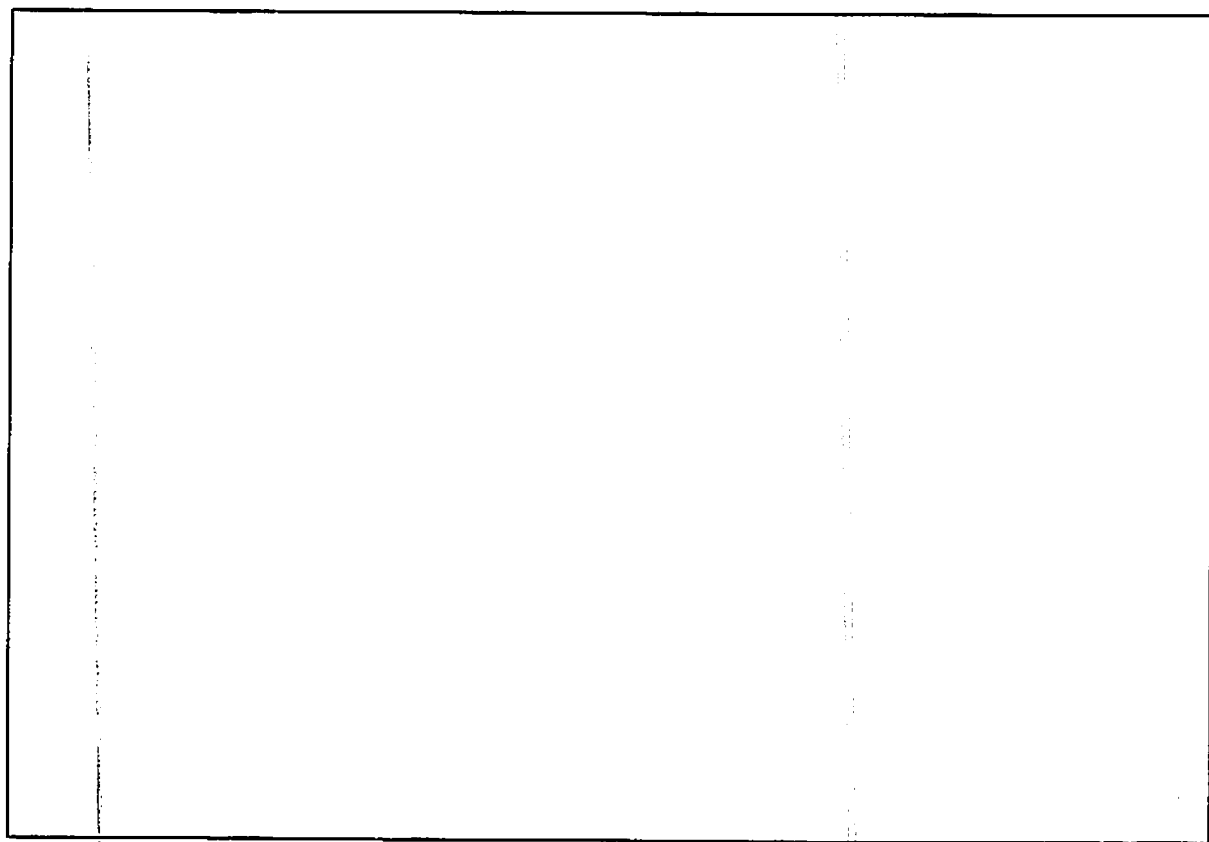
2,5mm

FIGURA 40. Cont. Formações estruturais de cristais de gelo em soluções aquosas compostas, 15% (B) e 20% (C) (arabinose, 2 : xilose, 1).



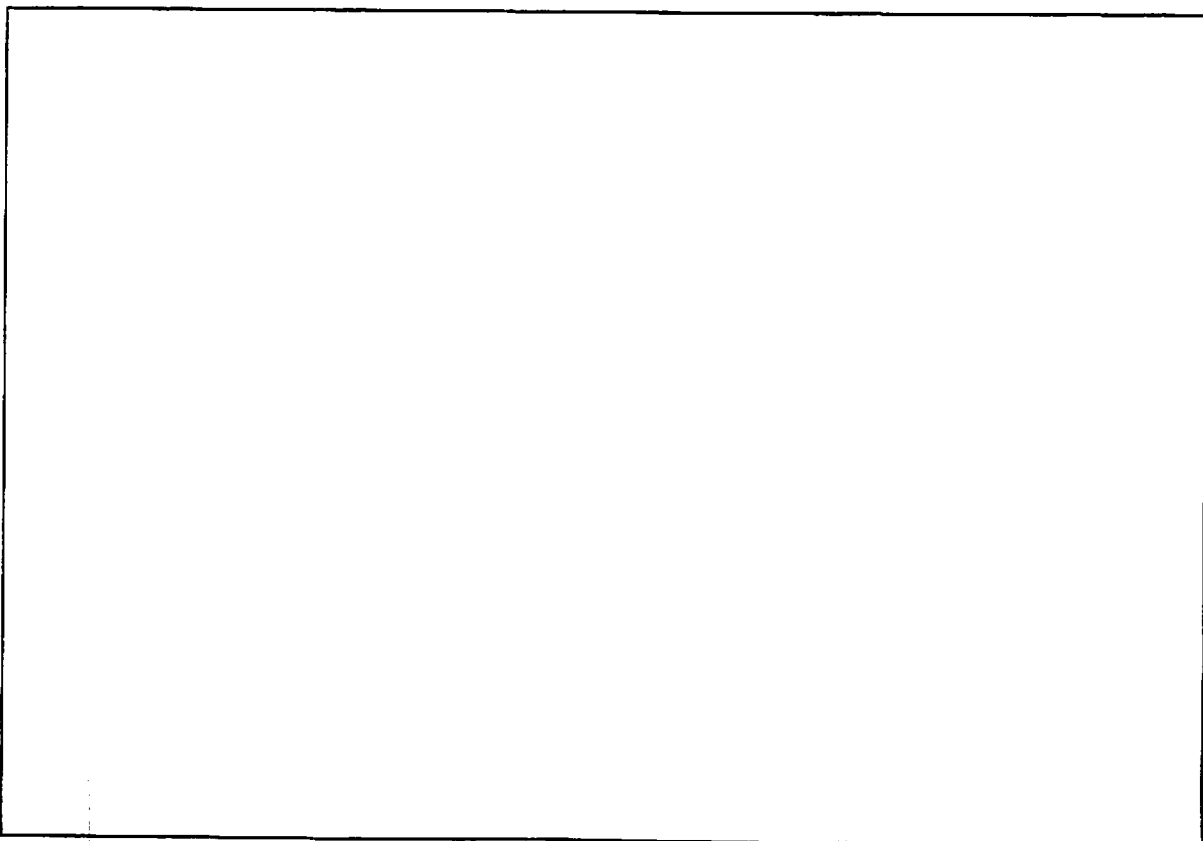
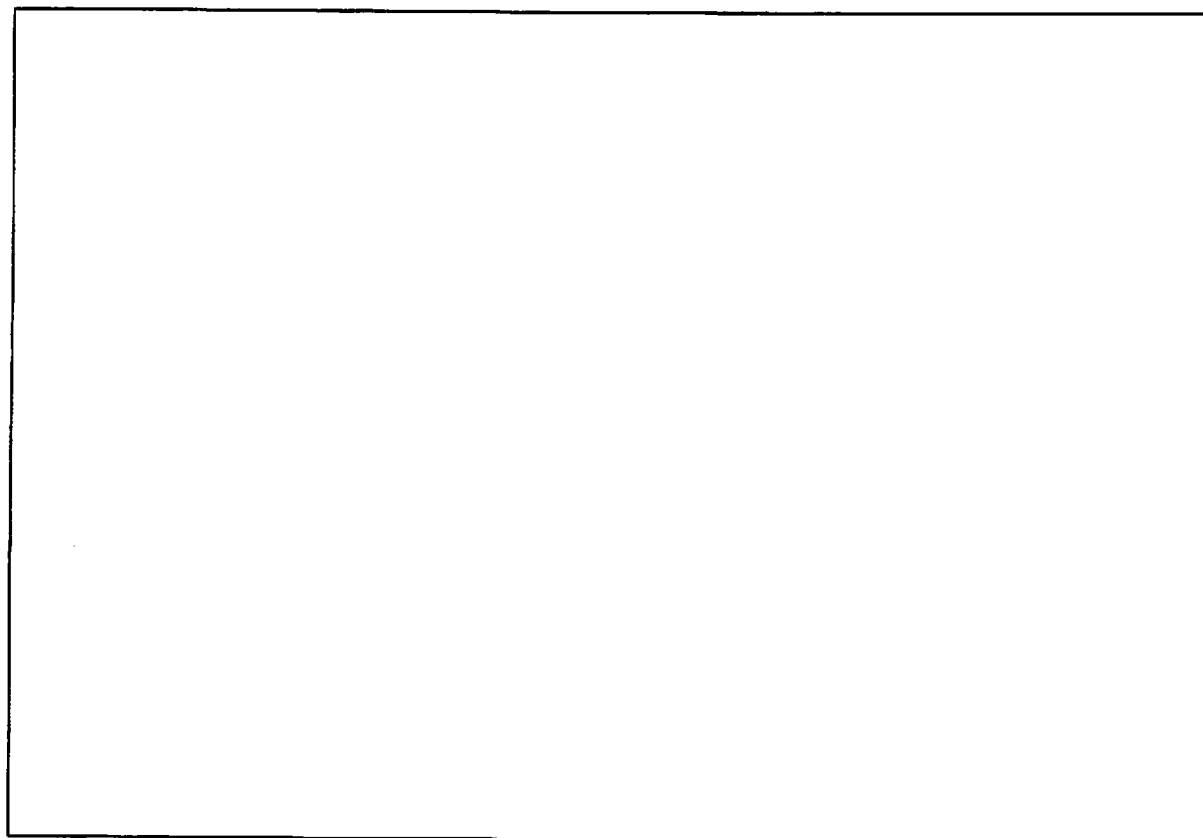
2,5mm

FIGURA 41. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas compostas 15% (A) e 20% (B) (arabinose, 1 : xilose, 2).



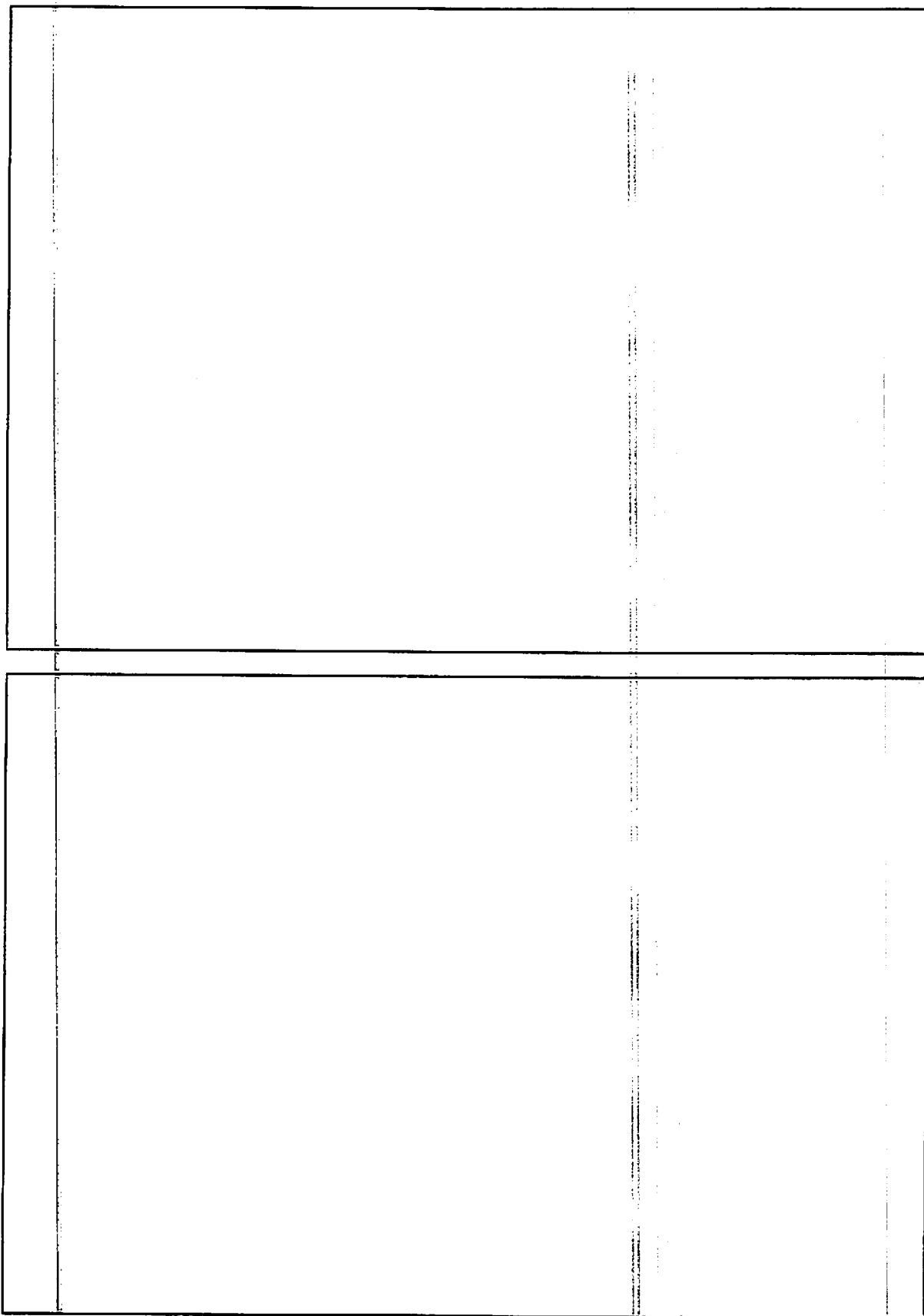
2,5mm

FIGURA 42. Formação de cristais de gelo em solução aquosa composta, 10% (arabinose, 2 : xilose, 2 : glicose, 1).



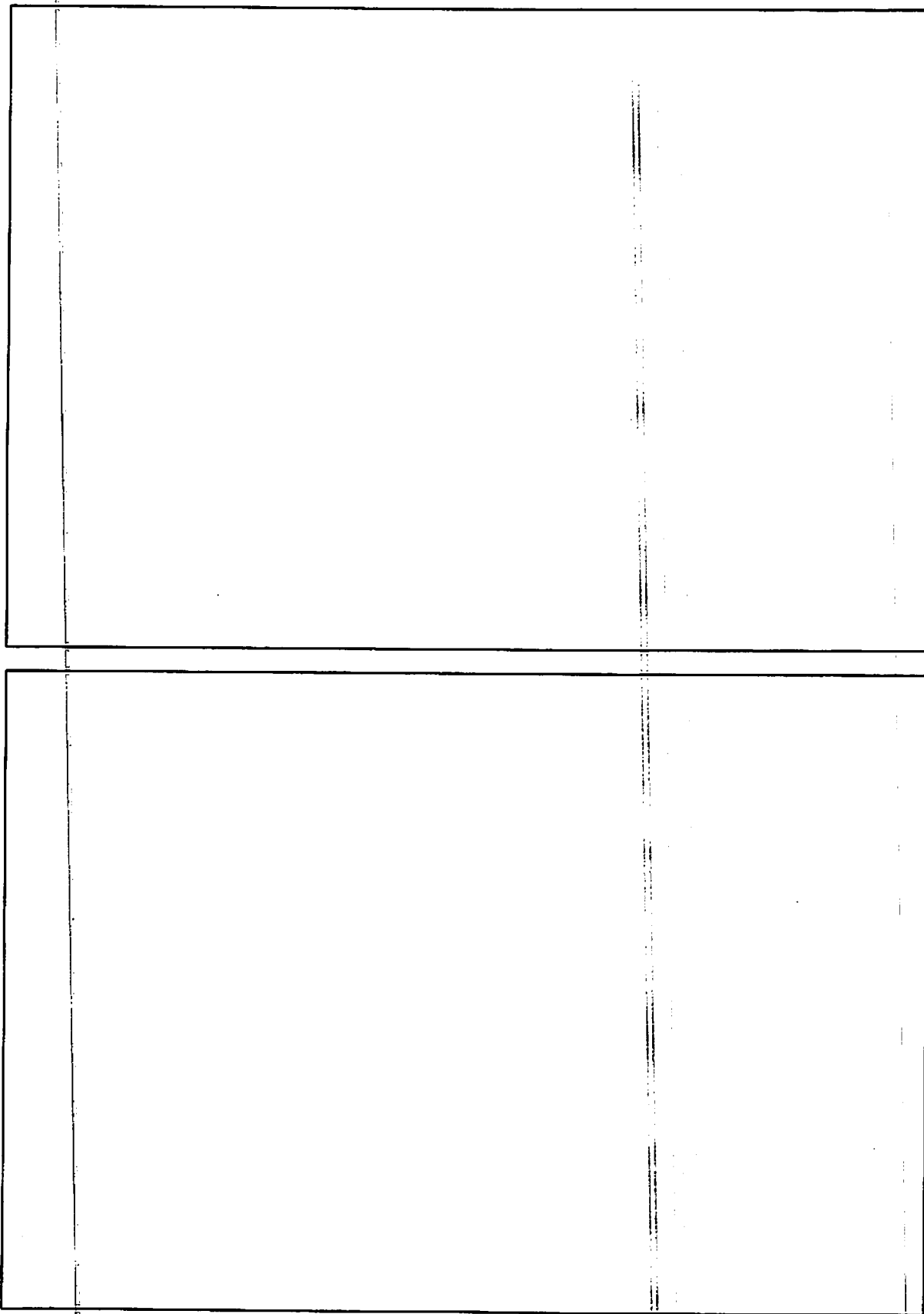
2,5mm

FIGURA 42, Cont. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas compostas, 15% (B) e 20% (C) (arabinose, 2 : xilose, 2 : glicose, 1).



2,5mm

FIGURA 43. Estruturação de cristais de gelo em glicose 30% (A) e solução composta, 10% (arabinose, 1 : xilose, 2) (B).



2,5mm

FIGURA 44. Estruturação de cristais de gelo em solução composta, 20% (arabinose, 2 : xilose, 1) (A) e solução de arabinose 20% (B).

Anderson, citado por Fennema, Powrie e Marth (1973), sugeriu que o nucleante e a zona adjacente das moléculas d'água parcialmente ordenadas podem facilitar a nucleação tridimensional. Nucleantes de reconhecida efetividade possuem a maioria das seguintes propriedades: baixa solubilidade na água; arranjo molecular cristalino similar ao gelo -caso dos nucleantes inorgânicos; habilidade para ligações de hidrogênio; relevante em nucleantes orgânicos; tamanho das moléculas d'água requeridas para o raio crítico, a serem acomodadas nas superfícies concavas, planas ou ainda convexas (Fig.45). Os açúcares cristalinos têm superfícies planas. Tipson, (1956) - citado por Fennema Powrie e Marth, (1973) sugeriu que um soluto não cristalizante pode: ser adsorvido na superfície do cristal, interferindo com a adição ordenada de moléculas d'água; aumentar a viscosidade (decrecendo a mobilidade das moléculas já cristalizadas); formar compostos com a água ou acentuar a solubilidade do soluto presente no meio.

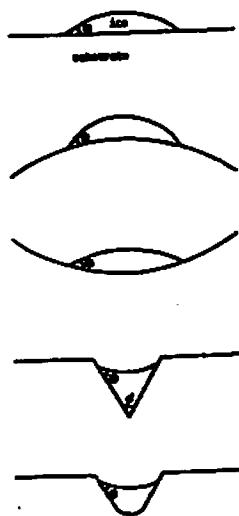


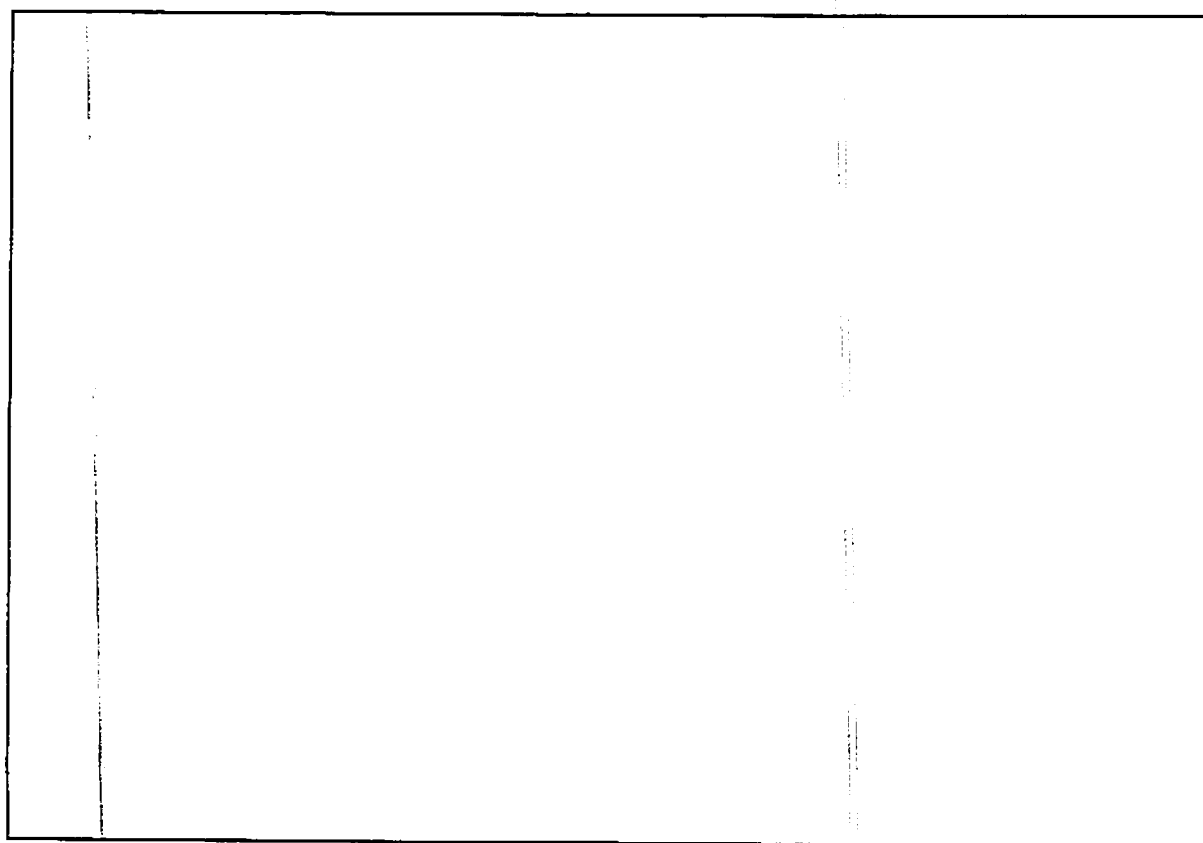
FIGURA 45. Formação do gelo em substratos de diferentes geometrias. a) substrato plano (Volmer, 1939), b) substrato esférico (Fletcher, 1958), c) substrato cônico (Mahata e Alofs, 1975), d) depressões cônicas (Wylie, 1953, Fletcher, 1969), e) depressão cônica com fundo achatado (Turnbull, 1950). (Autores citados por Muhr e Blanshard, 1986).

4.3 Influência da piridoxina (Vitamina B₆) e creatina (ácido α -metil-guanidoacético) sobre a estruturação dos cristais de gelo.

A Fig.46A mostra a configuração estrutural de cristais de gelo obtidos a partir de soluções aquosas contendo **piridoxina 1%**. Pode-se verificar o resultado da distribuição de soluto na grade de gelo de uma forma desordenada fazendo supor que as moléculas da vitamina se ligaram de forma caótica com as moléculas d'água (Fig.47).

O aumento das concentrações de piridoxina para os níveis de 5 e 15% (Fig.46B, e Fig.46C), provocou um arranjo ou conglomerado circular de cristais de gelo e piridoxina. Cada molécula d'água passou a ligar-se com até duas moléculas de piridoxina (Fig.48). Durante o congelamento da solução, a fase não congelada muda significativamente em propriedades físico-químicas, tensão superficial e interfacial. Além disto, a estrutura da água e interações soluto-água podem ser drasticamente alteradas e as macromoléculas serem forçadas a unirem-se em interações mais prováveis.

Em alguns casos, encontra-se que a distribuição e orientação dos sítios ligantes de hidrogênio dos solutos são geométricamente incompatíveis com os encontrados na água normal. Assim, essas classes de solutos frequentemente têm influências desestruturantes em meios aquosos. A uréia é um bom exemplo de um pequeno soluto ligante de hidrogênio que por razões geométricas tem um efeito marcadamente destrutivo na estrutura normal da água. Por razão similar, para muitos solutos ligantes de hidrogênio pode-se esperar este comportamento em posterior congelamento das soluções. As ligações de hidrogênio água-água destruídas podem ser substituídas por ligações de hidrogênio água-soluto. Pontes de hidrogênio da água podem acontecer com vários grupos potencialmente elegíveis (hidroxil, amina, carbonil, amida ou imina).



2,5mm

FIGURA 46. Configuração estrutural de cristais de gelo em solução aquosa de piridoxina 1%.

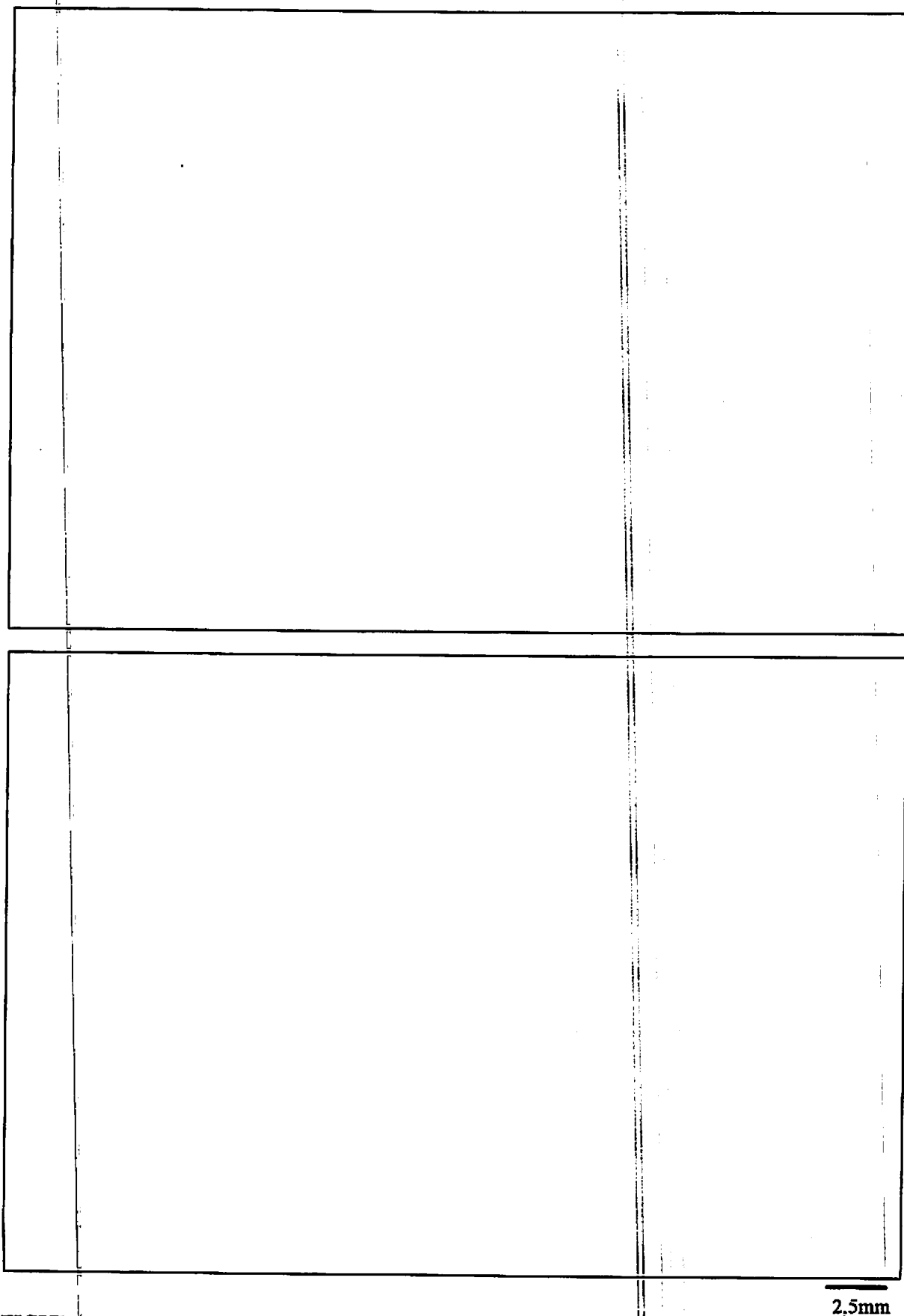


FIGURA 46, Cont. Arranjos estruturais de cristais de gelo em soluções aquosas de piridoxina 5% (B) e 15% (C).

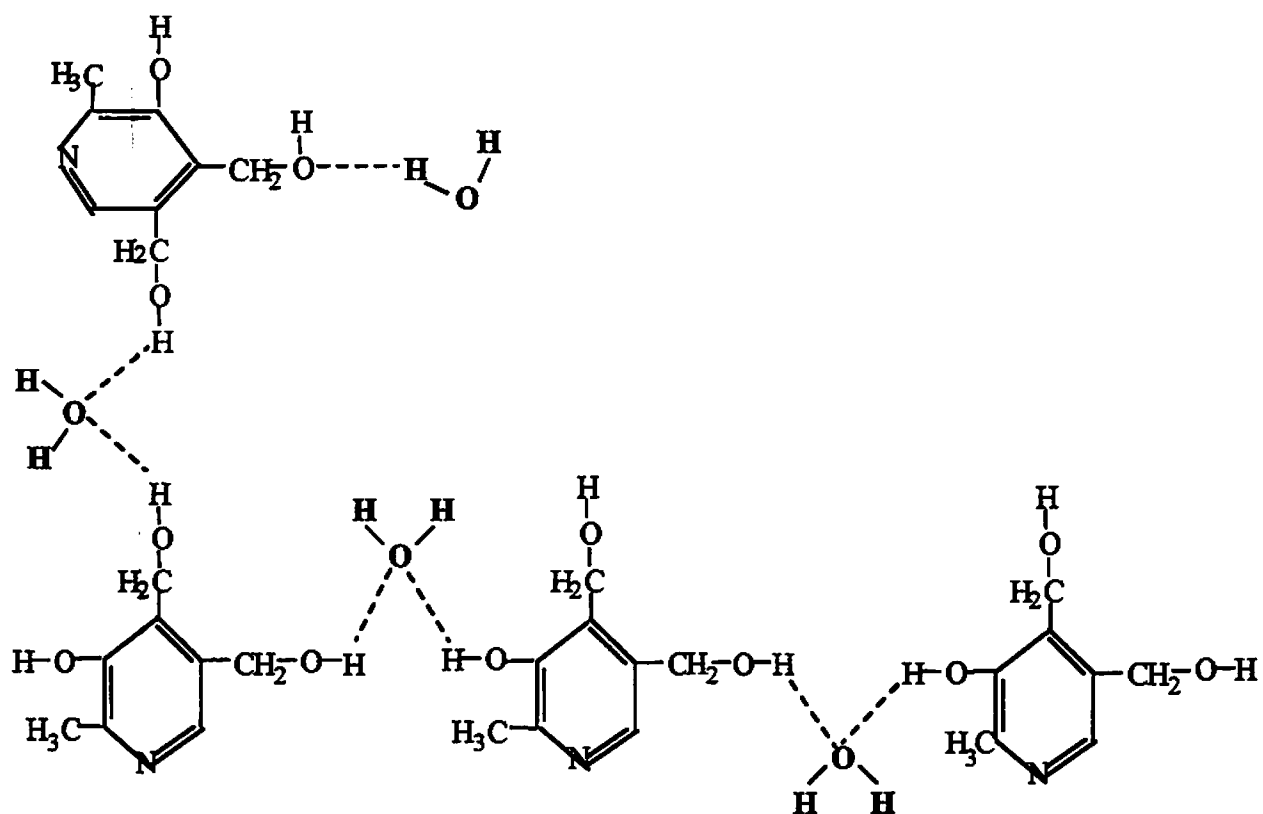


FIGURA 47. Modelo proposto para ligações na grade do gelo contendo baixa concentração de piridoxina (1%).

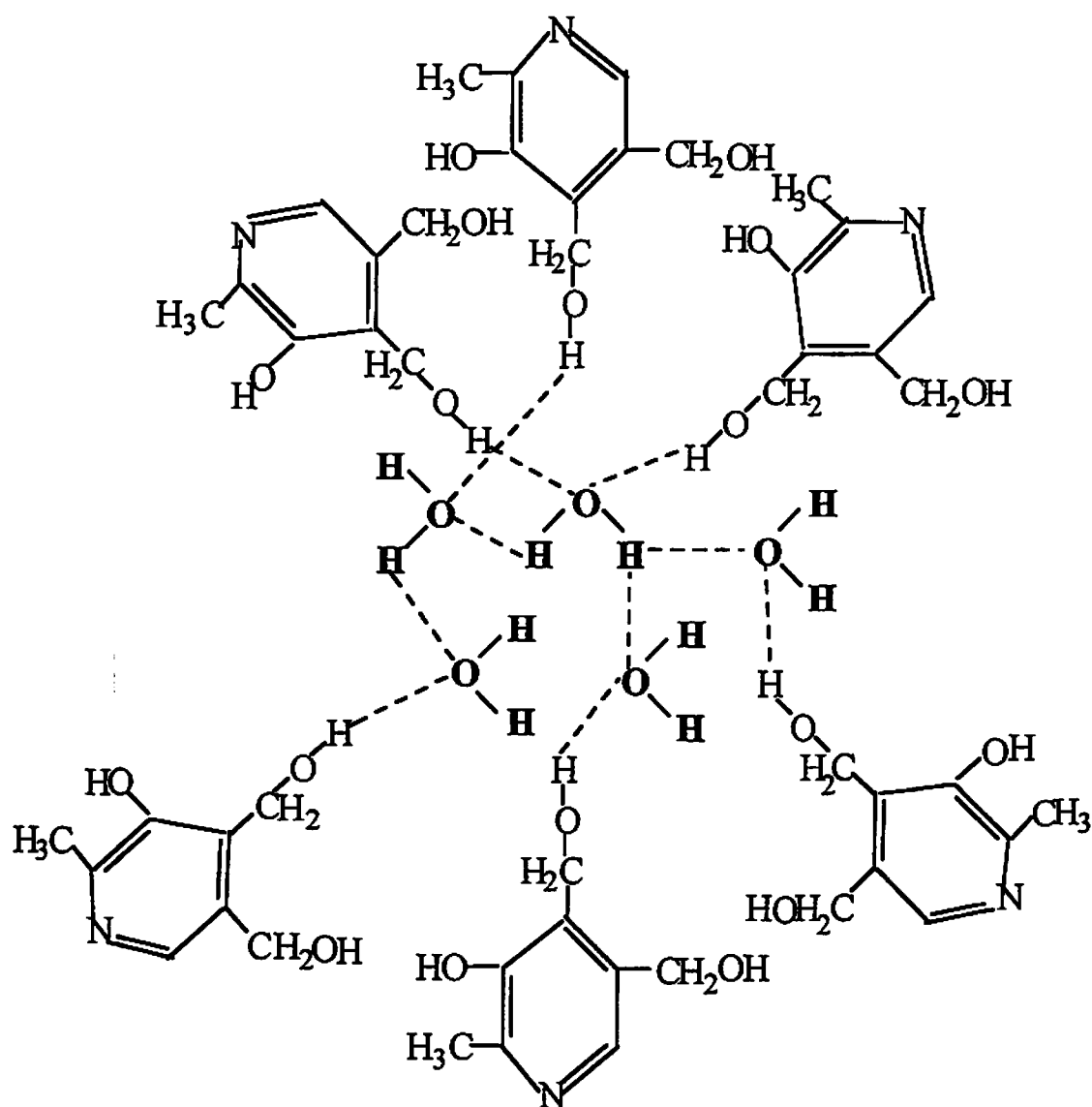


FIGURA 48. Modelo proposto para ligações na grade do gelo contendo piridoxina às concentrações de 5 e 15%.

Uma ou mais moléculas d'água podem formar uma ponte entre dois sítios em uma simples macromolécula ou entre duas macromoléculas.

Há poucos estudos tentando elucidar a influência de compostos vitamínicos sobre o crescimento de cristais de gelo.

As Fig.49A, 49B e 49C apresentam arranjos estruturais de cristais de gelo em soluções aquosas contendo creatina aos níveis 1, 3 e 5%, respectivamente. Esta estruturação mostra a formação de cristais orientados a partir de núcleos bem definidos. Neste caso tem-se a incidência de filamentos mais finos do que os observados para as amostras de piridoxina. Interessante notar ainda que estes filamentos tendem a apresentar um certo grau de arborização em suas extremidades. Esta característica pode constituir a solução técnica viável que se procura para reduzir danos celulares por cristais de gelo durante o congelamento, basta comprovar se este tipo de configuração também apresenta um grau de flexibilidade capaz de reduzir o dano celular físico-mecânico do tipo promovido pelas configurações cristalinas mais comuns.

4.4 Estruturação do gelo na presença de aminoácidos.

Na Fig.50A, mostra-se o arranjo estrutural do gelo sob a influência de metionina a 1%. Finas agulhas de metionina dão configuração aos cristais de gelo. Nas Fig.50B e 50C em níveis de 3 e 5%, respectivamente, as configurações angulosas parecem mais dispersas a partir dos arranjos e se difundem sobre a superfície do gelo. Isto deve-se ao fato de que a metionina é um aminoácido hidrofóbico e não se liga diretamente com a água. A propósito deste fato, lembramos que os grupos hidrofóbicos das substâncias adicionadas interagem fracamente com a água

adjacente preferindo um ambiente não aquoso. A água adjacente aos grupos hidrofóbicos assume um maior grau de estruturação do que o observado na água pura, resultado de uma mudança termodinâmica não favorável com o decréscimo da entropia. Para minimizar esta ocorrência termodinâmica desfavorável, os grupos hidrofóbicos tendem a agregar-se para minimizar seu contato com a água, num processo chamado **interação hidrofóbica**. As interações hidrofóbicas têm, relativamente, pouco direcionamento comparadas com as pontes de hidrogênio, mas produzem um sistema de alta estabilidade. De acordo com Lehninger (1970), muitos componentes celulares -em particular as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídeos polares- são anfipáticos e tendem a formar estruturas nas quais as partes hidrofóbicas não polares são escondidas da água.

Os cristais de gelo formados em solução aquosa contendo 1% de **arginina** (Fig.51A) apresentaram uma configuração hexagonal. A arginina é um aminoácido carregado positivamente e por esta razão interage com a água em uma conformação estável. Na concentração de 3% (Fig.51B) observa-se a formação de grandes cristais com algumas distorções. Isto pode ter sido ocasionado por um retardamento do processo de congelamento devido a natureza do soluto com uma maior migração das moléculas d'água para um menor número de núcleos formados. A presença de arginina próxima a interface do gelo pode também ser observada.

A Fig.51C mostra a presença de grandes e pequenos cristais de gelo. Isto possivelmente foi devido ao contrabalanceamento do congelamento tardio, que favoreceu a migração das moléculas d'água, e um aumento na concentração (5%), dificultando esta mesma migração. Verifica-se uma quantidade maior de arginina em cada cristal de gelo.

A arginina e o ácido aspártico são encontrados nos terminais amino e carboxílico, respectivamente, da maior proteína anticongelante de winter flounder que é uma simples α -hélice com caráter anfílico tendo, ao longo de uma face da hélice, resíduos de aminoácidos hidrofílicos sendo potenciais sítios para ligações de hidrogênio com o átomo de oxigênio na grade do gelo.

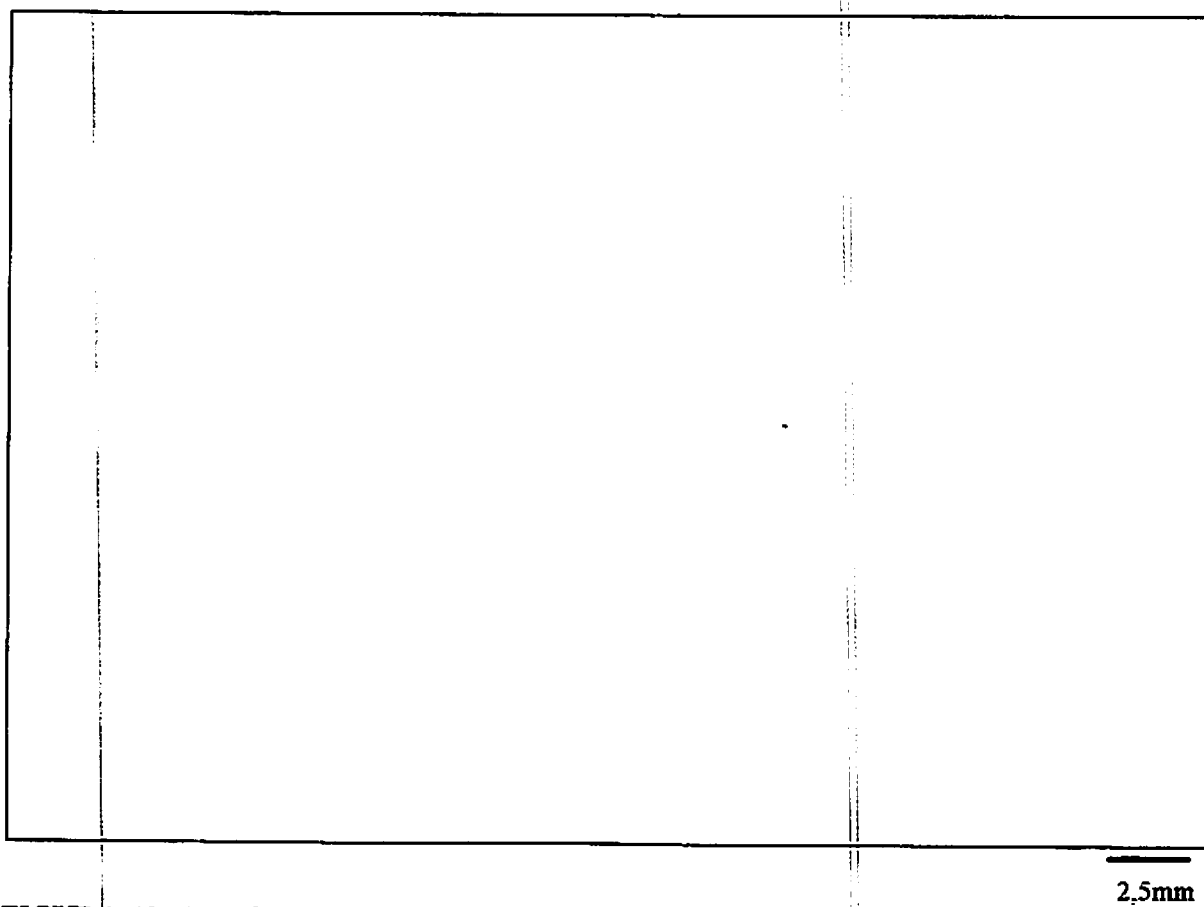
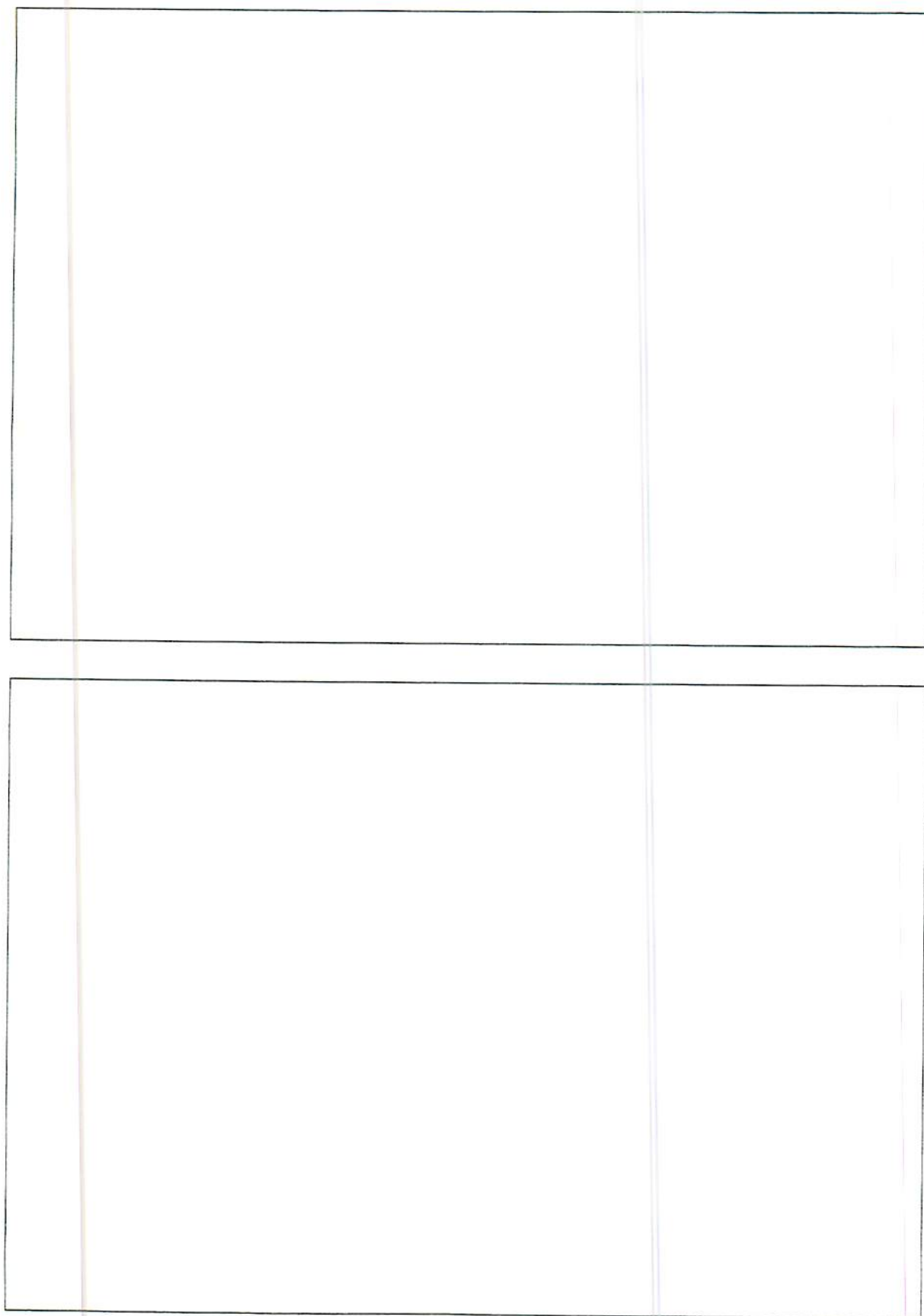


FIGURA 49. Arranjos estruturais de cristais de gelo em solução aquosa de creatina 1%.



2.5mm

FIGURA 49. Cont. Arranjos estruturais de cristais de gelo em soluções aquosas de creatina 3% (B) e 5% (C).

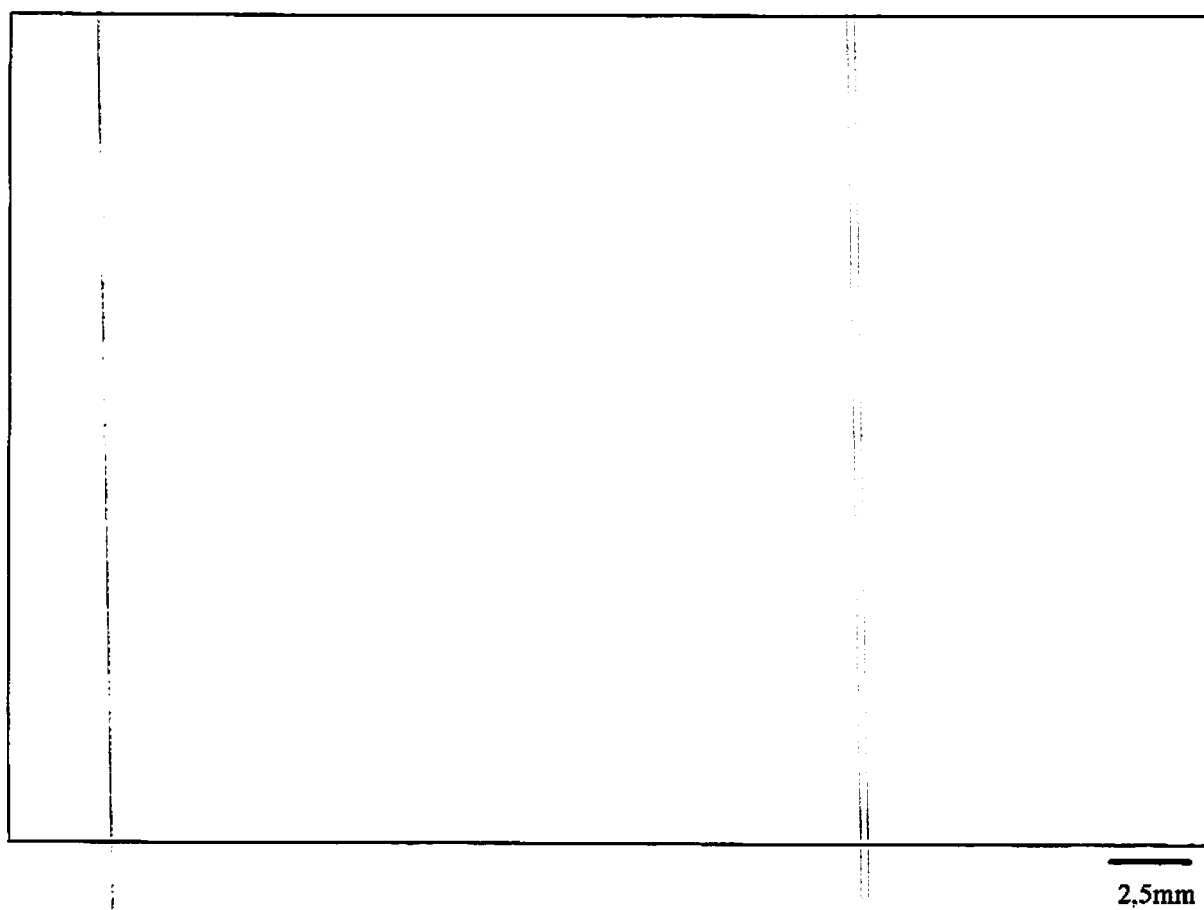


FIGURA 50. Arranjos estruturais de cristais de gelo em solução aquosa contendo metionina 1%.

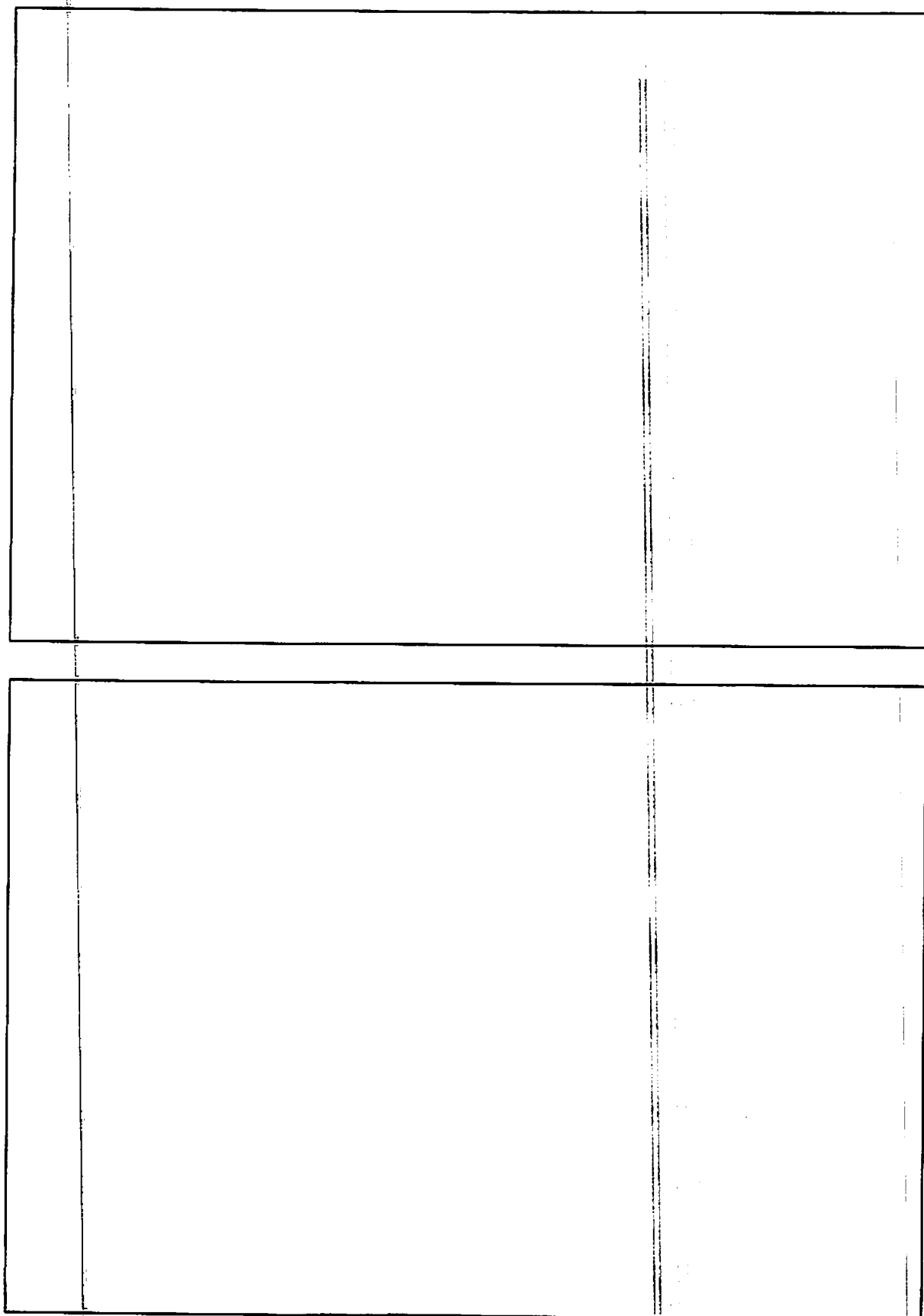
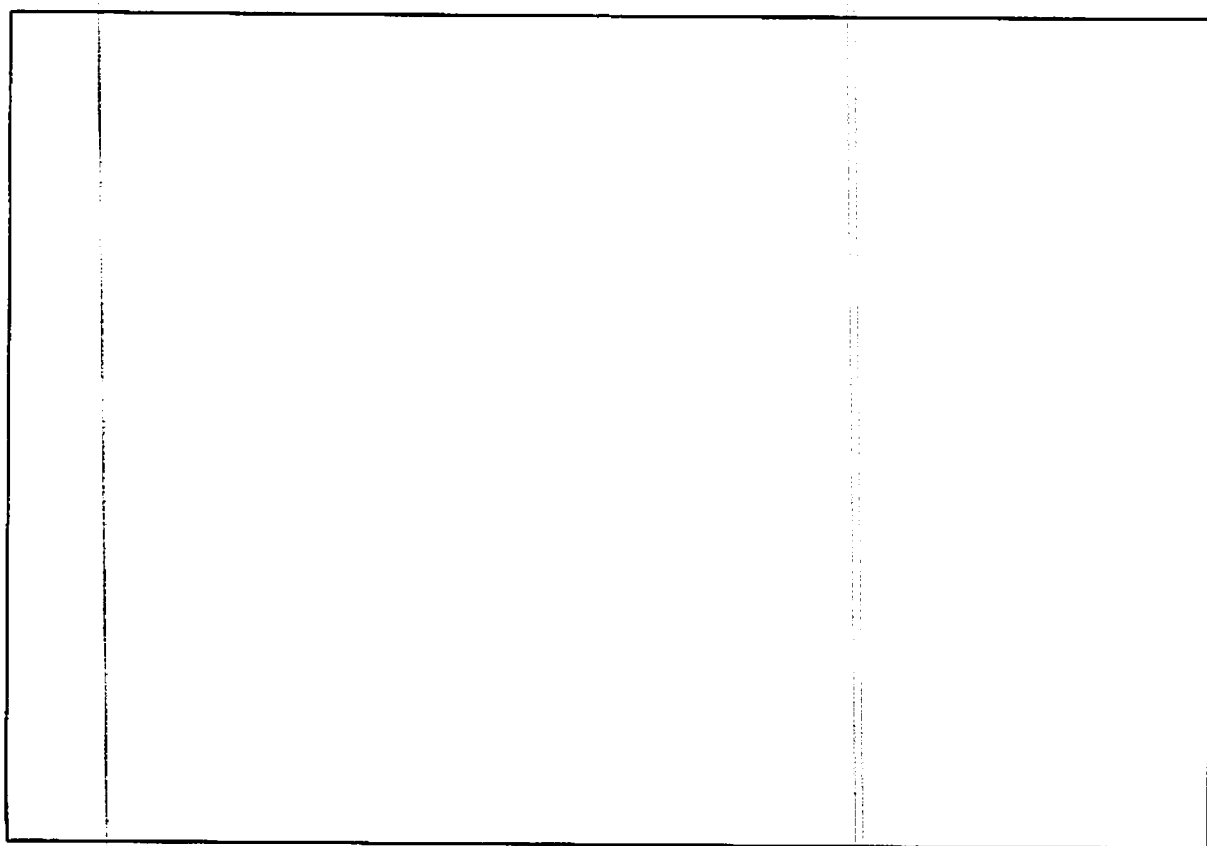
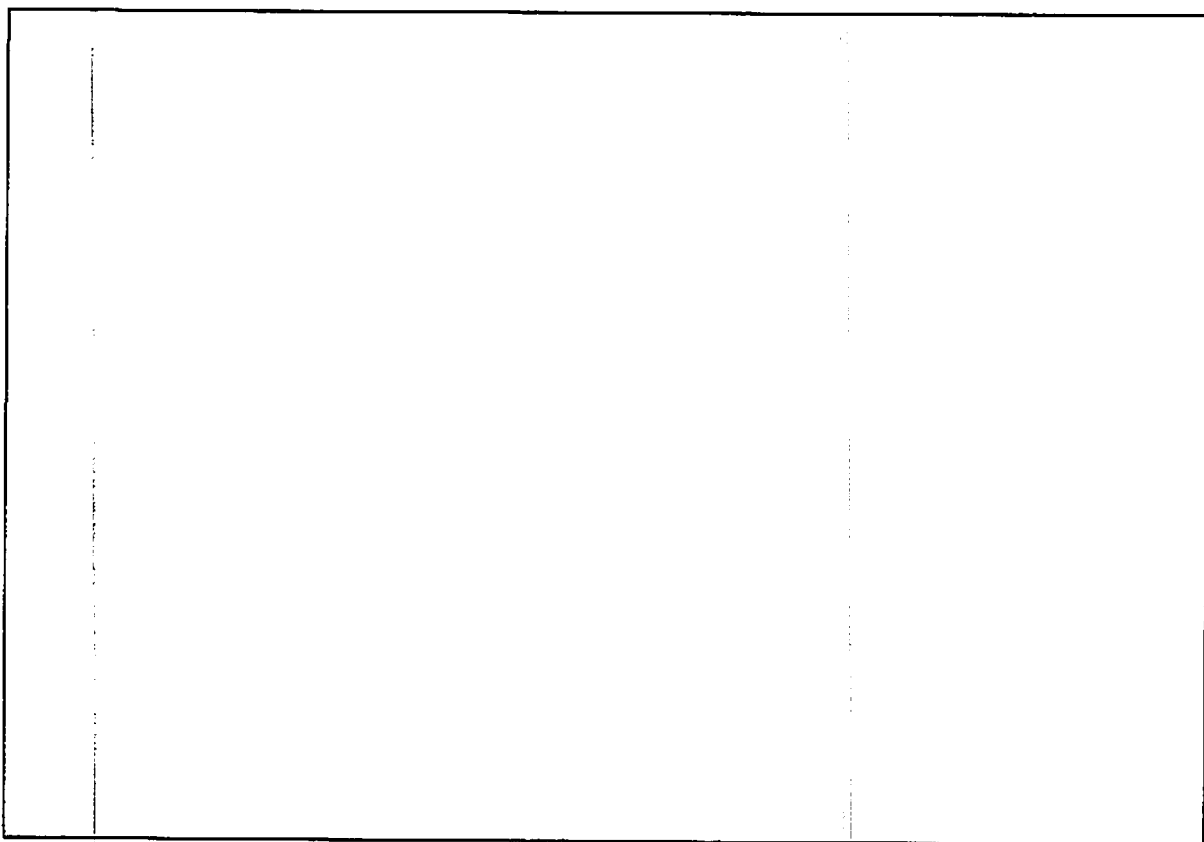
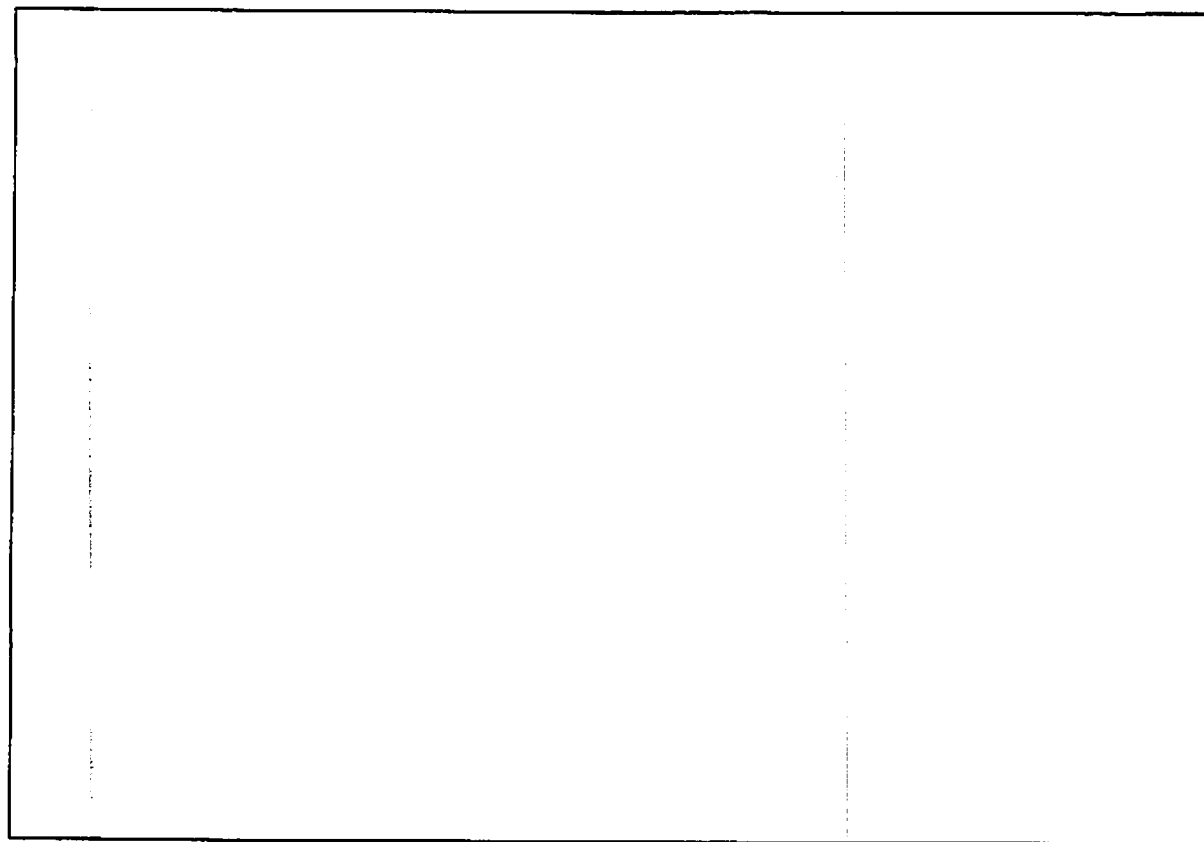


FIGURA 50. Cont. Arranjos estruturais de cristais de gelo em soluções aquosas contendo metionina 3% (B) e 5% (C).



2.5mm

FIGURA 51. Cristais de gelo em solução aquosa contendo arginina 1%.



2,5mm

FIGURA 51. Cont. Estruturas cristalinas em soluções aquosas contendo arginina 3% (B) e 5% (C).

Esses aminoácidos quando carregados são idealmente localizados para estabilizar a conformação α -hélice destas proteínas por meio de interações dipolares. Uma interação entre o dipolo da hélice da AFP com os dipolos de moléculas individuais d'água em um cristal de gelo foi proposta para explicar a orientação preferencial das hélices de AFPs paralelamente ao eixo c de um cristal de gelo (Yang et al., 1988).

Fig.52A mostra a formação de cristais de gelo, em solução contendo 1% de lisina, um pouco disformes mas em alguns casos com tendência a arredondar. Os cristais apresentaram-se maiores do que os formados na presença de arginina. Isto deve-se, possivelmente ao fato da lisina apresentar um peso molecular mais baixo do que esta, dificultando menos a migração das moléculas d'água. A lisina é também um aminoácido carregado positivamente e interage com as moléculas d'água estruturando o gelo. **Fig.52B** mostra a formação de cristais de gelo hexagonais bem definidos, na presença de 3% de lisina. A presença de poucos cristais de lisina adsorvidos na superfície dos cristais de gelo, pode indicar uma concentração onde foi atingido o equilíbrio entre os sítios ligantes da água e do soluto. Em uma concentração mais elevada deste aminoácido - 5% (**Fig.52C**), o equilíbrio foi rompido e formaram-se cristais mais alongados para reduzir a energia livre do sistema.

As substâncias devem ser cristalinas para serem efetivas como nucleantes. Como consequência, muitas substâncias potencialmente nucleantes que são constituintes comuns da matéria biológica (colesterol, aminoácidos, proteínas) não funcionam bem como nucleantes efetivos em seus estados nativos (Fukuta e Mason, 1963 citados por Fennema, Powrie e Marth, 1973).

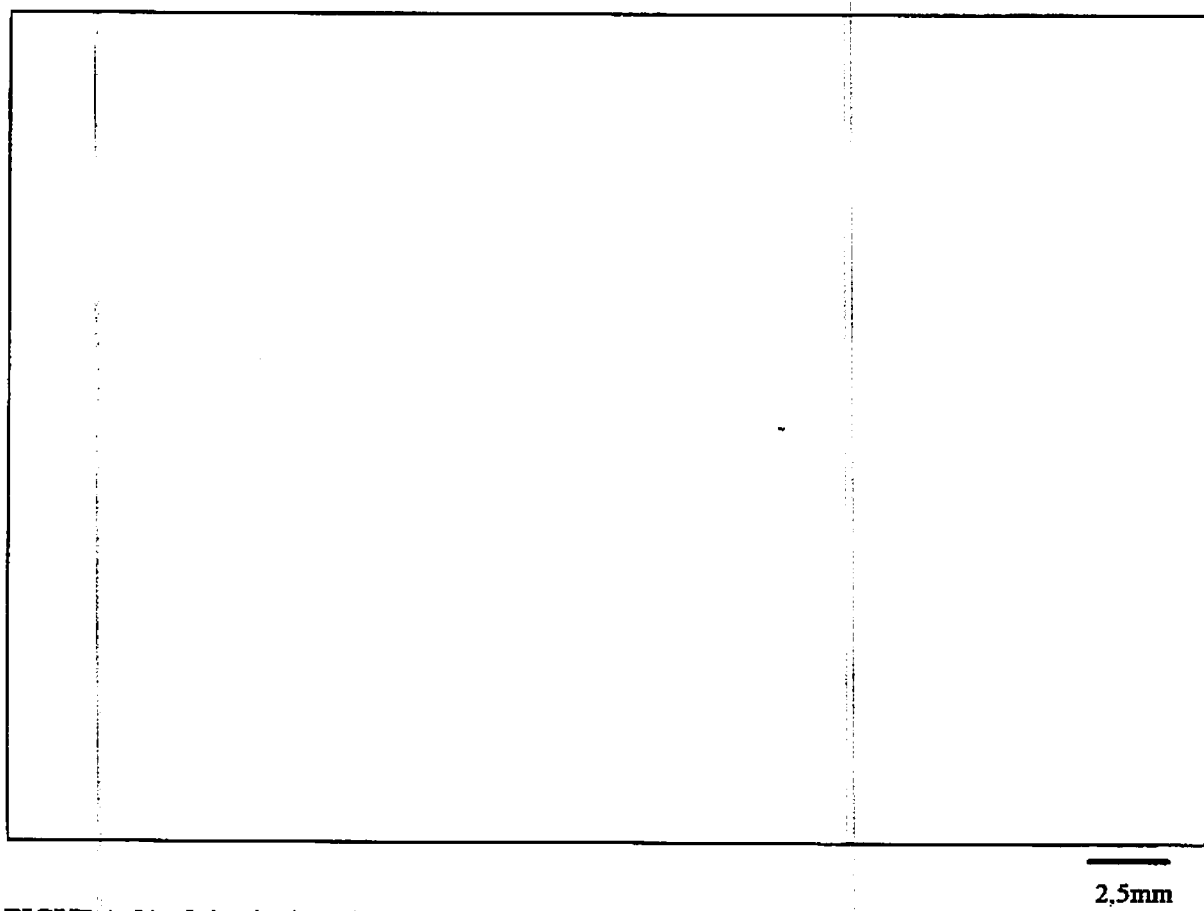
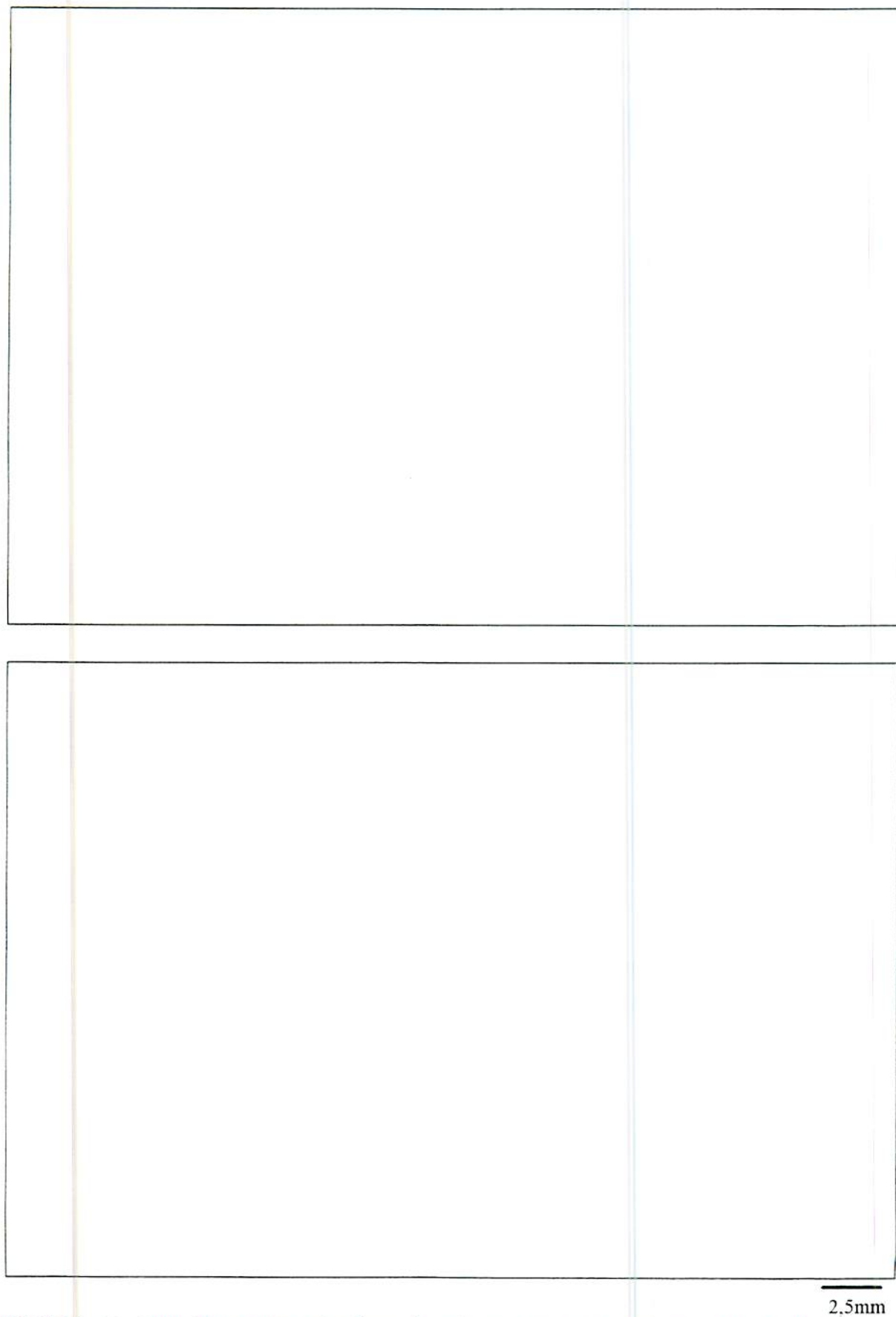


FIGURA 52. Cristais de gelo em solução aquosa contendo lisina 1%.



2,5mm

FIGURA 52, Cont. Estruturas cristalinas de gelo em soluções aquosas contendo lisina 3% (B) e 5% (C).

5 CONCLUSÕES

A conformação estrutural de certas substâncias que possuem sítios ligantes, bem como a sua concentração e possíveis combinações em soluções aquosas, influenciam definitivamente a estruturação e morfologia de cristais de gelo.

Os açúcares ligam-se fortemente às moléculas d'água obedecendo uma estreita relação com sua natureza química, estabelecendo configurações hexagonais ou arbóreas.

Substâncias hidrofílicas como a piridoxina podem ligar-se caoticamente com as moléculas d'água ou arranjar-se em conglomerados circulares.

A existência de fenômenos hidrofóbicos provoca a formação de estruturas filamentosas, adsorvidas na superfície do gelo.

Aminoácidos carregados positivamente como a arginina e a lisina podem também estruturar cristais de gelo na forma hexagonal. O efeito da concentração é mais ou menos efetivo dependendo do aminoácido presente.

6 POSSÍVEIS APLICAÇÕES DECORRENTES DESTE TRABALHO

1. Os resultados obtidos possibilitam a amplificação do uso de substâncias crioprotetoras para prevenir o dano celular.
2. A estruturação e morfologia dos cristais de gelo obtidos permitem visualizar melhor seu potencial de ação junto à parede celular, levando em conta sua interface e configuração geométrica.
3. Algumas das novas estruturações encontradas possibilitam a redução potencial do dano celular.
4. Os resultados obtidos contribuem com novas possibilidades para a predição do dano celular em frutos congelados, notadamente por estabelecer a possibilidade do dano físico-mecânico a partir da estrutura observada nos cristais de gelo construídos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHWORTH, E.N. The formation and distribution of ice within forsythia flower buds. **Plant Physiology**, New York, v.92, n.3, p.718-725, Mar. 1990.
- BAE, S.K., MIYAWAKI, O. Progressive freeze-concentration and its relationship with the ice structure at freezing front. In: YANO, T., MATSUNO, R. e NAKAMURA, K. (eds.) **Developments on Food Engineering**. London:Blackie Academic and Professional, 1994. p. 382-384. (Proceedings of the 6th International Congress on Engineering and Food).
- BARROW, G.M. **Moléculas en los cristales: estructuras moleculares**. Barcelona:Editorial Reverté, 1972. p. 47-87.
- BARTOLOME, A.P., RUPEREZ, P., FUSTER, C., Freezing rate and frozen storage effects on color and sensory characteristics of pineapple fruit slices. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.1, p.154-160, Jan./Fev. 1996.
- BEČAK, W., PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v.1, 305p.
- BENGTSSON, N., FERNQUIST, I. New methods for ultrafast freezing of foods. **SIK Annual Report**, London, n.294, p.251-253, 1971.
- BOMBEN, J.L., KING, C.J.; Heat and mass transport in the freezing of apple tissue. **Journal of Food Technology**, Oxford, v.17, n.5, p.615-632, Oct. 1982.
- BRANDTS, J.F. The low temperature denaturation of chymotrypsinogen in aqueous solution and in frozen aqueous solution, In: WOLSTENHOLME, G.E.W., O'CONNOR, M. (eds.), **The frozen cell**. London, 1970. p. 189-209.

- CALDWELL, K.B., GOFF, H.D., STANLEY, D.W. A low-temperature scanning electron microcopy study of ice cream. II. influence of selected ingredients and processes. **Food Structure**, Chicago, v.11, n.1, p.11-23, 1992.
- CHAKRABARTTY, A., YANG, D.S.C., HEW, C.L. Structure-function relationship in a winter flounder antifreeze polypeptide. **The Journal of Biological Chemistry**. Chicago, n.264, n.19, p.11313-11316, Oct. 1989.
- CHALMERS, B. **Principles of solidification**. New York: Wiley, 1964. 328p.
- CHEFTEL, J.C., CHEFTEL, H., BESANÇON, P. **Introdução a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos**, Zaragoza: Acribia, 1982. v.2, p.175-187.
- CHOU, D., MORR, C., Protein-water interactions and functional properties. **Journal Americal Oil Chemistry Society**. Chicago, v.56, p:53A-62A, 1979.
- DONHOWE, D.P., HARTEL, R.W., BRADLEY JR., R.L. Determination of ice crystal size distributions in frozen desserts. **Journal Dairy Science**. Champaign, v.74, n.10, p.3334-3344, Oct. 1991.
- ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Solid state of matter, Chicago: The University of Chicago, 1976. p.1032-1044.
- FEENEY, R.E., YEH, Y. Antifreeze proteins from fish bloods. **Advances Protein Chemistry**. Chicago, v.32, p.191-282, 1978.
- FEENEY, R.E., YEH, Y. Antifreeze proteins: properties, mechanism of action, and possible applications. **Food Technology**. Chicago, v.47, n.1, p.82-90, Jan. 1993.
- FENNEMA, O. R., POWRIE, W. D., MARTH, E. H. **Low-Temperature Preservation of Foods and Living**. New York: Marcel Dekker, 1973. 754p.
- FENNEMA, O. R. Water and ice, In: __. **Food Chemistry**. New York: Marnel Dekker, 1982. p.23-67.
- FENNEMA, O. R. Instability of nonequilibrium states of water in frozen foods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.11, n.2, p.152-169, jul./set. 1991.
- FERRERO, C.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N.E.; Effect of freezing rate and xanthan gum on the properties of starch and wheat flour pastes. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v.28, p.481-498, 1993.
- FLETCHER, N.H. **The chemical physics of ice**. Cambridge: Cambridge University Press, 1970. 132p.

- FLINK, J. The influence of freezing conditions on the properties of freeze-drying coffee. In: GOLDBLITH, S.A., REY, L., ROTHMAYR, W.W. (eds.). **Freeze Drying and Advanced Food Technology**. New York: Academic Press Inc., 1975. p.143-160.
- FUCHIGAMI, M., MIYAZAKI, K., HYAKUMOTO, N. NOMURA, T., SASAKI, J. Texture and histological structure of carrots frozen at a programmed rate and thawed in an electrostatic field. **Journal of Food Science**. Chicago, v.59, n.6, p.1162-1168, Nov./Dez. 1994.
- FUCHIGAMI, M., MIYAZAKI, K., HYAKUMOTO, N. NOMURA, T., SASAKI, J. Chinese cabbage midribs and leaves physical change as related to freeze-processing. **Journal of Food Science**. Chicago, v.60, n.6, p.1260-1264, Nov./Dez. 1995.
- GOFF, H.D., CALDWELL, K.B., STANLEY, D.W. The influence of polysaccharides on the glass transition in frozen sucrose solutions and ice cream. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v.76, n.5, p.1268-1277, May. 1993.
- GOSSETT, P., BAKER, R. Effect of pH and of succinylation on the water retention properties of coagulated, frozen and thawed egg albumin. **Journal of Food Science**. Chicago, v.48, n.5, p.1391-1394, Sept./Out. 1983.
- GRIFFITH, M., ALA, P., YANG, D.S.C., HON, W.C., MOFFATT, B.A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. **Plant Physiology**. New York, v.100, n.2, p.593-596, Oct. 1992.
- GUEGOV, Y. Phase transitions of water in some products of plant origin at low and superlow temperatures. **Advances in Food Research**. New York, v.27, p.297-353, 1981.
- HALLET, J. Nucleation and growth of ice crystal in water and biological systems. In: HAWTHORN, J. e ROLFE, E.J. (eds.). **Low Temperature Biology of Foodstuffs**. Oxford: Pergamon, 1968. p. 23-52.
- HARTEL, R.W., CHUNG, M.S. Contact nucleation of ice fluid dairy products. **Journal of Food Engineering**. London, v.18, n.3, p.281-296, Jul./Sept. 1993.
- HON, W.C., GRIFFITH, M., MLYNARZ, A., KWOK, Y.C., YANG, D.S.C. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. **Plant Physiology**. New York, v.109, n.3, p.879-889, Nov. 1995.
- KOSTER, K.L., LYNCH, D.V. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. **Plant Physiology**. New York, v.98, n.5, p.108-113, Jan. 1992.
- LEHNINGER, A.L. **Biochemistry**. New York: Worth Publishers Inc., 1970. 1103p.

- LEIBO, S.P., MAZUR, P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. **Cryobiology**, New York, v.8, n.1, p.447-452, Jan. 1971.
- LENIGER, H. A.; BEVERLOO, W.A.; **Food Process Engineering**, Boston:D. Reidel Publishing Company. 1975. 552p.
- LEVITT, J. A Sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. **Journal Theoretical Biology**. Chicago, v.3, n.1, p.335-391, Jan.-Mar. 1962.
- LOVELOCK, J.E.The Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. **Process Research Society**. London, v. B, n.147, p. 427-433, Sept. 1957.
- MACKENZIE, A.P. Collapse during freeze-drying - qualitative and quantative aspects. In: GOLDBLITH, S.A., REY, L., ROTHMAYR, W.W. (eds.). **Freeze Drying and Advanced Food Technology**. New York:Academic Press Inc., 1975. p. 277-307.
- MALTINI, E., ANSELMi, G. Comportamento termico dei succhi di agrumi allo stato congelato. **Annual Istituto Superior de Valorizzazione Tecnologica de Productio Agricola**. Milano, v.2, p.315-325, 1971.
- MARTÍ, J., AGUILERA, J.M. Efecto de la velocidad de congelación en las características mecánicas y microestructurales del arándano y de la mora silvestre. **Revista Agroquímica Tecnologica Alimentar**. Valencia, v.31, n.4, p.493-504, abr. 1991.
- MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **Journal Genetics Physiology**. v.47, n.6, p.347-369, Nov./Dez. 1963.
- MCCURDY, R.D., GOFF, H.D., STANLEY, D.W. Properties of dextran as a cryoprotectant in ice cream. **Food Hydrocolloids**. London, v.8, n.6, p.625-633, Nov./Dez. 1994.
- MERYMAN, H.T. Modified model for mechanism of freezing injury in erythrocytes. **Nature**, London, v.218, p.333-336, Mar. 1968.
- MIYAWAKI, O., ABE, T., YANO,T. Freezing and ice structure formed in protein gels. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. Tokyo, v.56, n.6, p.953-957, Nov./Dez. 1992.
- MIYAWAKI, O., BAE, S.K. Ice structure and its control in frozen food gels. In: YANO, T., MATSUNO, R. e NAKAMURA, K. (eds.) **Developments on Food Engineering**. London:Blackie Academic and Professional, 1994. p.373-375. (Proceedings of the 6th International Congress on Engineering and Food).
- MONSALVE-GONZÁLES, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., CAVALIERI, R.P., Mass transfer and textural changes during processing of apples by combined methods. **Journal of Food Science**, Chicago, v.5, n.4, p.1118-1124, Jul./Ago. 1993.

- MONZINI, A. Considerazioni sulle precongelo dei prodotti da liofilizzazione. **Annual Istituto Superior de Valorizzazione Tecnologica de Producta Agricola**. Milano, v.4, p.109-129, 1973.
- MUHR, A.H., BLANSHARD, J.M.V. Effect of polysaccharide stabilizers on the rate of growth of ice. **Journal of Food Technology**, Oxford, v.21, n.6, p.683-710, Dez. 1986.
- PAOLETTI, F., MENESATTI, P., Effetto del pretrattamento con Ca^{2+} sulla texture di mele golden delicious congelate o osmodisidratate. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, n.32, p.34-41, 1993.
- QUAMME, H.A., SU, W.A., VETO, L.J. Anatomical features facilitating supercooling of the flower within the dormant peach flower bud. **Journal American Society Horticultural Science**. Chicago, v.120, n.5, p.814-822, Sept. 1995.
- QUERVAIN, M.R. Crystallization of water, a review. In: GOLDBLITH, S.A., REY, L., ROTHMAYR, W.W. (eds.). **Freeze Drying and Advanced Food Technology**. New York:Academic Press Inc., 1975. p.3-16.
- RASMUSSEN, D.H., LOPER, C.R. DSC-A rapid method for isothermal nucleation rate measurement. **Acta Metallurgical**. New York, v.24, p.117, 1976.
- REID, D.S. A programmed controlled temperature microscope stage. **Journal Microscopy**. Oxford, n.13, p.114-241, 1978.
- REID, D.S. Fundamental physicochemical aspects of freezing. **Food Technology**, Chicago, v.37, n.4, p.110-115, Apr. 1983.
- RESENDE, J.V. Redução de danos de congelamento em frutos de melão utilizando substâncias crioprotetoras de concentrações e origens diversas. Lavras:Universidade Federal de Lavras, 1995, 136p. (Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- RESENDE, J.V., CAL-VIDAL, J. Reducing freeze damage in fruits. In: JOWITT, R. **Engineering & food at ICEF 7**. London:Shelffield Academic Press, 1997. p. SA1-SA4. (Supplement Proceedings of the 7th International Congress on Engineering and Food).
- REY, L.R. Some basic facts about freeze-drying. In: GOLDBLITH, S.A., REY, L., ROTHMAYR, W.W. (eds.). **Freeze Drying and Advanced Food Technology**. New York:Academic Press Inc., 1975. p. 42-53.
- RISTIC, Z., ASHWORTH, E.N. Ultrastructural evidence that intracellular ice formation and possibly cavitation are the sources of freezing injury in supercooling wood tissue of *Cornus florida* L. **Plant Physiology**. New York, v.103, n.3, p.753-761, Nov. 1993.

- ROOS, Y., KAREL, M. Effects of glass transitions on dynamic phenomena. In: Blanshard, J.M.V (ed.). **The Glassy State**. Nottingham:Nottingham University Press, 1991. 542p.
- RUSSELL, A.B. Control of ice crystallisation in scraped surface ice cream freezers. In: JOWITT, R. **Engineering & food at ICEF 7**. London:Sheffield Academic Press, 1997. pt.1, p. B17-B20 (Proceedings of the 7th International Congress on Engineering and Food).
- SCHNEPF, M. Protein-water interactions. In: HARDMAN, T.M. (ed.). **Water and Food Quality**. London:Elsevier Science Publishers, 1989. p. 135-168.
- SHIRAI, Y., NAKANISHI, K., MATSUNO, R., KAMIKUBO, K. On the kinetics of ice crystallization in batch crystallizers. **AIChE Journal**, New York, v.31, n.4, p.676-682, Jul./Ago. 1985a.
- SHIRAI, Y., NAKANISHI, K., MATSUNO, R., KAMIKUBO, K. Effects of polymers on secondary nucleation of ice crystals. **Journal of Food Science**. Chicago, v.50, n.2, p.401-406, Mar./Abr. 1985b.
- SHIRAI, Y., SAKAI, K., NAKANISHI, K., MATSUNO, R. Analysis of ice crystallization in continuous crystallizers based on a particle size-dependent growth rate model. **Chemical Engineering Science**. Tokyo, v.41, n.9, p.2241-2246, Sept. 1986.
- SHIRAI, Y., SUGIMOTO, T., HASHIMOTO, M., NAKANISHI, K., MATSUNO, R. Mechanism of ice growth in a batch crystallizer with an external cooler for freeze concentration. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v.51, n.9, p.2359-2366, Sept. 1987.
- SIMATOS, D., FAURE, M., BONJOUR, E., CAUACH, M. The physical state of water at low temperatures in plasma with different water contents as studied by differential thermal analysis and differential scanning calorimetry. **Cryobiology**. New York, v.12, n.3, p.202-208, Mar. 1975.
- SIMATOS, D., TURC, J.M. Fundamentals of freezing in biological systems. In: GOLDBLITH, S.A., REY, L., ROTHMAYR, W.W. (eds.). **Freeze Drying and Advanced Food Technology**. New York:Academic Press Inc., 1975. p. 17-28.
- SIMATOS, D. Structure du produit pendant la congélation, la dessiccation et à état lyophilisé. **Bulletin Institut Froid**. Paris, v.56, n.1, p.227, Jan. 1976.
- SLADE, L., LAVINE, H. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. In: Fergus M. Clydesdale (ed.). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Florida:CRC Press Inc., v.30, n.2-3, p.115-360, Feb./Mar. 1991.

- SPIESS, W.E.L. Impact of freezing rates on product quality of deep-frozen foods., Helsinki:Elsevier Science Publishers, 1980. p.689-94. (Proceedings of the 2th International Congress on Engineering and Food and the 8th European Food Symposium).
- STERLING, C. Effect of low temperature on structure and firmness of apple tissue. **Journal of Food Science**, Chicago, v.33, n.5, p.577-580, Sept./Oct. 1968.
- SUSUKI, K., HAGURA, Y. A new freeze-concentration process for food solutions employing pressure during freezing to control the growth rate, size and shape of ice crystals. In: JOWITT, R. **Engineering & food at ICEF 7**. London:Shelffield Academic Press, 1997. pt.2, p. G25-G28. (Proceedings of the 7th International Congress on Engineering and Food).
- THOMAS, V., SMITH, D. Cryogenic light microscopy and the development of long-term cryopreservation techniques for fungi. **Outlook on Agriculture**. Cambridge, v.23, n.3, p.163-167, Mar. 1994.
- TRGO, C., KOXHOLT, M., KESSLER, H.G. Influences on formation and growth of ice crystals in ice cream. In: JOWITT, R. **Engineering & food at ICEF 7**. London:Shelffield Academic Press, 1997. pt.1, p. A45-A48. (Proceedings of the 7th International Congress on Engineering and Food).
- TORREGGIANI, D. Osmotic dehydration in fruit and vegetable processing. **Food Research International**. Toronto, v.26, n.3, p.59-68, Mai./Jun. 1993.
- VAN DEN BERG, L. The effect of addition of sodium and potassium chloride to the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ on pH and composition during freezing. **Archives Biochemistry Biophysics**. Orlando, v.84, n.3, p.305-315, Mar. 1959.
- VAN DEN BERG, L. Physicochemical changes in food during freezing and subsequent storage. In: HAWTHORN, J.H. e ROLFE, E.J. (eds.). **Low Temperature Biology of Foodstuffs**. Oxford:Pergamon Press, 1968. p.205.
- WARMUND, M.R. Ice distribution in 'Earliglow' strawberry crowns and tissue Recovery Following Extracellular Freezing. **Americal Society Horticultural Science**. Chicago, v.118, n.5, p.644-648, Sept./Oct. 1993.
- WARNER, D.T. Theoretical studies of water in carbohydrates and proteins. In: Stewart, G.F. e Rockland, L. (eds.). **Water Activity: Influences on Food Quality**. New York:Academic Press Inc., 1981. p. 435-465.
- WOINET, B., ANDRIEU, J., LAURENT, M. Theoretical and experimental study of mean ice crystal size in model frozen foods. In: JOWITT, R. **Engineering & food at ICEF 7**. London:Shelffield Academic Press, 1997. pt.1, p. A5-A8. (Proceedings of the 7th International Congress on Engineering and Food).

YOON, K.S., LEE, C.M. Cryoprotectant effects in surimi and surimi/mince-based extruded products. **Journal of Food Science**. Chicago, v.55, n.5, p.1210-1216, Sept./Out. 1990.