



**ESTRUTURAÇÃO DE CRISTAIS DE GELO E  
SUA INFLUÊNCIA NO DANO CELULAR**

**CLÉCIA DA SILVA CARNEIRO**

**2001**

THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF PHYSICS  
530 SOUTH EAST ASIAN AVENUE  
CHICAGO, ILLINOIS 60607

52801

470950

DESCARTADO

*meifei*  
ASSINATURA

Data 15, 08, 17

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
UFLA

CLÉCIA DA SILVA CARNEIRO

**ESTRUTURAÇÃO DE CRISTAIS DE GELO E SUA INFLUÊNCIA  
NO DANO CELULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Curso  
de Doutorado em Ciência dos Alimentos,  
para obtenção do título de Doutor.

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

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Carneiro, Clécia da Silva

Estruturação de cristais de gelo e sua influência no dano celular / Clécia da Silva  
Carneiro. --Lavras: UFLA, 2001.

166 p. : il.

Orientador: José Cal-Vidal.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cristal de gelo. 2. Estruturação e dano celular. 3. Fruto tropical congelado. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-664.80582



**CLÉCIA DA SILVA CARNEIRO**

**ESTRUTURAÇÃO DE CRISTAIS DE GELO E SUA INFLUÊNCIA NO  
DANO CELULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso de Doutorado  
em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título  
de Doutor.

**APROVADA em 9 de novembro de 2001**

**Prof. Dr. Theo G. Kieckbusch**

**UNICAMP**

**Profa. Dra. Lisete C. Davide**

**UFLA**

**Dra. Mônica Elisabeth T. Prado**

**UFLA**

**Profa. Dra. Fabiana Q. Ferrua**

**UFLA**



**Prof. Dr.-Eng. José Cal-Vidal**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**

**A Deus, que nos conduz pela mão quando nossa visão está embaçada e nos conforta quando sofremos pelo que não entendemos.**

**A Deus, que nos conduz pela mão quando nossa visão está embaçada e nos conforta quando sofremos pelo que não entendemos.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e apoio na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Cal-Vidal que, com o seu modo de orientar, me ensinou a trilhar mais firmemente o meu caminho.

Ao Prof. Dr. Theo G. Kieckbusch, pelo seu reconhecimento e manifestação em relação ao mérito de nosso trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro oferecido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos projetos de pesquisa financiados durante o nosso trabalho.

Aos Profs. Drs. José da Cruz Machado, Elliot W. Kitajima e Manuel L. Gavilanes, pela colaboração técnica oferecida durante a realização do plano experimental de microscopia ótica e eletrônica.

Aos colegas do Laboratório de Microestrutura e Arquitetura Alimentar, pelo agradável convívio nos mais diversos momentos desta pesquisa.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	i
RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	05
2.1 Estrutura e características físico-químicas da água líquida .....	05
2.2 Interações água-soluto .....	12
2.3 Fenômenos decorrentes da remoção de calor do sistema .....	30
2.3.1 Sub-resfriamento .....	30
2.3.2 Nucleação .....	33
2.3.3 Mudança de fase a baixas e superbaixas temperaturas .....	36
2.3.3.1 Cristalização .....	36
2.3.3.2 Vitrificação .....	43
2.4 A morfologia do gelo .....	50
2.4.1 Gelo hexagonal ( $I_h$ ) .....	57
2.4.2 Gelo cúbico ( $I_c$ ) .....	59
2.4.3 Gelo vítreo ( $I_v$ ) .....	60
2.4.4 Demais arranjos cristalinos .....	62
2.5 A presença d'água nas células e tecidos .....	65
2.6 Distúrbios celulares provocados pelo congelamento .....	71
2.7 Danos físico-mecânicos na parede celular de frutos .....	75
2.8 Tentativas de redução de danos celulares mediante o monitoramento de cristais de gelo .....	78
2.8.1 Monitoramento do número e tamanho de cristais de gelo .....	78



2.8.2 Possibilidades de mudanças na estruturação e morfologia de cristais de gelo .....	81
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>86</b>
3.1 Congelamento de soluções-modelo .....	86
3.2 Preparação das amostras para microscopia ótica (MO) .....	92
3.3 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	96
3.4 Observações microestruturais .....	98
3.4.1 Microscopia ótica .....	98
3.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão .....	99
<b>4 RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>100</b>
4.1 Estruturação de cristais de gelo .....	100
4.1.1 Estruturação do gelo na presença de açúcares .....	100
4.1.2 Influência da riboflavina e do ácido 4-aminobenzóico na estruturação de cristais de gelo .....	105
4.1.3 Estruturação do gelo sob a influência de aminoácidos .....	110
4.2 Danos em tecidos vegetais .....	125
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>146</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>147</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>148</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\Delta G^*$	Varição em energia livre na formação de um agregado tipo gelo de tamanho crítico
$\Delta T$	Varição de temperatura
AFGPs	Glicoproteínas anticongelantes (Antifreeze Glycoproteins)
AFP(KE) <sub>2</sub>	Polipeptídeos anticongelantes que apresentam a sequência Ala7→Lys, Ala11→Glu, Ala29→Lys e Ala33→Glu
AFPs	Proteínas anticongelantes (Antifreeze Proteins)
$C'_g$	Máxima concentração da matriz não congelada
$C_v$	Concentração crítica para vitrificação
$d_p$	Tamanho médio do cristal de gelo
FAA	Mistura fixadora contendo formaldeído, ácido acético e álcool etílico
$\phi$	Diâmetro
$h$	Altura
$I_A$	Gelo amorfo
$I_c$	Gelo cúbico
$I_h$	Gelo hexagonal
$I_v$	Gelo vítreo
J	Velocidade de nucleação homogênea
K	Velocidade de transferência de massa de moléculas d'água
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NL	Nitrogênio líquido
$P_m$	Pressão de fusão
PM	Peso molecular
P-V-T	Diagrama de equilíbrio para pressão, volume e temperatura do gelo
SLS	Soluções aquosas de lactose e sacarose
T	Temperatura absoluta
$T_B$	Temperatura de transição vítrea
$T'_g$	Temperatura de transição vítrea da matriz não congelada
$T_m$	Temperatura de fusão
z	Número de coordenação

## RESUMO

**CARNEIRO, Clécia da Silva. Estruturação de cristais de gelo e sua influência no dano celular. 2001. 166p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\***

A estruturação de cristais de gelo e suas implicações nos danos celulares causados em frutos congelados foram consideradas neste estudo. Frutos foram submetidos a infusão com diferentes substâncias anteriormente ao congelamento lento dos mesmos ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Açúcares (frutose e raminose) promoveram estruturas hexagonais, arbóreas e de transição, causando danos mecânicos e severa desidratação celular. Vitaminas anfífilas promoveram estruturas hexagonais (riboflavina) ou hexagonais e micelares (ácido 4-aminobenzóico) de acordo com o seu potencial hidrofílico, tendo a riboflavina promovido um menor dano dos tecidos. Aminoácidos (cisteína, ácido glutâmico, prolina e glicina) estruturaram cristais essencialmente do tipo hexagonal, outros porém (metionina e ácido aspártico) ordenaram as moléculas d'água em cristais retangulares e feixes perpendiculares, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos com a infusão de prolina nos frutos diante da sua capacidade de promover cristais pequenos e arredondados.

---

\*Orientador: Prof. Dr. José Cal-Vidal - UFLA. Membros da Banca: Prof. Dr. Theo G. Kieckbusch – UNICAMP, Profa. Dra. Lisete C. Davide – UFLA, Dra. Mônica Elisabeth T. Prado – UFLA e Profa. Dra. Fabiana Q. Ferrua - UFLA

## 1 INTRODUÇÃO

Muitas reações que causam mudanças na relação normal da água e os outros componentes de produtos alimentares mudam suas características, assim como ocorre no congelamento (Matz, 1965; Taylor, 1969). Nestes, a água nunca aparece no estado puro, e sim em forma de soluções. Por conseguinte, uma parte d'água se acha firmemente ligada às estruturas protéicas e polissacarídeos. Estes influenciam essencialmente as propriedades físicas da água, por exemplo, reduzindo a temperatura de congelamento, aumentando a temperatura de ebulição e reduzindo a tensão de vapor d'água sobre a solução (Horne, 1970; Gruda e Postolski, 1981; Garrett e Grisham, 1995).

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 sua estrutura, causando-lhe danos. Para otimizar a qualidade de alimentos, é essencial entender os efeitos do congelamento, condições de estocagem e descongelamento na textura e microestrutura dos mesmos.

Tecidos vegetais são muito susceptíveis a danos por cristais de gelo em suas membranas ou paredes celulares (Carneiro, 1997). É um grande desafio o congelamento de frutos sem a alteração de sua textura ou pigmentação. Mudanças no volume da água durante a cristalização e a perfuração das células por protudentes cristais promovem desprendimentos das porções celulares e o colapso do tecido, causando perda de líquido por exsudação durante o descongelamento. A concentração dos solutos orgânicos no interior das células causa mudanças no pH e força iônica, promovendo a perda da capacidade de retenção d'água por alterações nas membranas. A rigidez das paredes celulares ajuda a

evitar danos mecânicos pelos cristais de gelo (De Almeida, Carneiro e Cal-Vidal, 2001).

Pesquisadores têm seguido diferentes caminhos na tentativa de redução dos danos celulares, assim como, mudanças na velocidade do processo, utilização de substâncias crioprotetoras, mudanças na pressão, etc. No entanto, ainda não foi encontrado o processo ideal.

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 texturométrica. As substâncias crioprotetoras têm reduzido danos celulares conjuntamente com o congelamento criogênico, porém, a toxicidade destas torna-se um fator limitante (Echlin, 1992).

O congelamento rápido evita a perfuração das paredes celulares e o colapso do tecido pela redução em tamanho dos cristais de gelo. No entanto, danifica a organização interna das células, causando o rompimento de membranas e a compartimentalização celular, induzindo ainda largas rachaduras no produto por súbita contração (Edwards e Hall, 1988; Slade e Levine, 1991).

A modificação da pressão à qual é submetida o alimento a congelar provoca a redução no tamanho dos cristais de gelo (Chevalier, Bail e Ghoul, 2000a,b), porém não tem evitado danos e, em alguns casos, tem reduzido a viabilidade das células (Kalichevsky, Knorr e Lillford, 1995).

Solutos presentes na água também podem influenciar diretamente a morfologia dos cristais de gelo. Em soluções de moléculas polifuncionais, as propriedades físico-químicas são determinadas, principalmente, pela direta ligação de hidrogênio da água com sítios específicos no soluto. Já que é uma orientação altamente específica, é esperado que a detalhada estereoquímica das moléculas do soluto desempenhem um importante papel. A estruturação destes cristais, com a conseqüente mudança em sua morfologia, pode ser de suma importância



para evitar danos físicos à microestrutura de frutos (Cal-Vidal e Carneiro, 2000; Cal-Vidal e Carneiro, 2001; Carneiro e Cal-Vidal, 2001).

A estrutura do gelo a pressão normal ou reduzida pode tomar três formas básicas: hexagonal, cúbica e vítrea. Soluções aquosas podem ser congeladas nessas três formas de gelo, dependendo de fatores como: tamanho da amostra, grau de subresfriamento, velocidade de congelamento, natureza e concentração de solutos presentes, etc. (Runnels, 1966; Franks, 1975). A estrutura do cristal hexagonal é muito lábil e mudanças na pressão, temperatura de congelamento, velocidade de congelamento e materiais dissolvidos podem prontamente afetá-la. Os cristais hexagonais podem ser muito grandes, com muitos braços e apresentar defeitos, como limites granulares, amontoamento, contornos curvos e deslocamentos, estendendo-se por longas distâncias na amostra (Némethy, 1966; Fletcher, 1970; Roos e Morgan, 1990).

Açúcares (arabinose, xilose e glicose) promoveram configurações estruturais, variando de cristais hexagonais uniformes a hexagonais dendríticos, com o aumento da concentração. Este fenômeno está relacionado a um impedimento físico das moléculas d'água pelas moléculas de soluto, favorecendo sua ligação ao longo deste, enquanto moléculas de água pura ocupam os espaços intersticiais dos dendritos (Carneiro e Cal-Vidal, 1998a). A combinação destes açúcares provocou comportamento semelhante. No entanto, pôde-se observar que a adição de glicose aos sistemas arabinose:xilose resultou em uma estrutura intermediária mais estável por ter a glicose uma maior estabilidade conformacional com a grade cristalina (Carneiro e Cal-Vidal, 2000b).

Vitamina B6 (piridoxina) e creatina promoveram arranjos micelares devido à sua natureza anfifílica. Esta classe de soluto (moléculas com estrutura em anel) teve um efeito destrutivo da estruturação normal da água, provocando regiões de interações polares e não polares (Carneiro e Cal-Vidal, 1998b).

Aminoácidos (metionina, arginina e lisina) influenciaram a estruturação dos cristais de gelo por interações apolares ou por cargas positivas. A metionina provocou a formação de finas ou largas agulhas, em diversas regiões da amostra, devido à sua hidrofobicidade. As interações hidrofóbicas têm, relativamente, pouco direcionamento em comparação com as pontes de hidrogênio, mas produzem um sistema de alta estabilidade. Os cristais de gelo formados em solução aquosa contendo arginina e lisina apresentaram configuração hexagonal por influência do grupamento básico adicional destes aminoácidos. No caso da arginina, apresentando cristais menores, devido a um peso molecular mais elevado (Carneiro e Cal-Vidal, 2000a,c).

No presente estudo foram utilizados açúcares, vitaminas e aminoácidos, com os objetivos de:

- estabelecer a influência destas substâncias na estruturação e morfologia de cristais de gelo, partindo de soluções-modelo;
- monitorar a estruturação e morfologia de cristais de gelo com o uso de microscopia ótica e eletrônica, visando ao controle de possíveis danos celulares;
- correlacionar as estruturas e morfologias encontradas com sua influência no dano celular.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

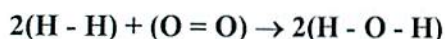
### 2.1 Estrutura e características físico-químicas da água líquida

A elucidação da estrutura da água pura é um problema extremamente complexo. Muitas teorias têm sido estabelecidas, mas todas são incompletas, excessivamente simples e frágeis, sendo citadas rapidamente por sustentadores de teorias rivais.

A natureza momentânea das ligações dá lugar a dificuldades no estudo da água, levando a diferentes teorias sobre sua estrutura. Fennema (1977) dividiu estas teorias em duas grandes categorias: (1) teoria contínua, que é também chamada de teoria uniforme ou homogênea e (2) teoria mista. A teoria contínua propõe que todas as moléculas em um líquido resfriado estejam totalmente ligadas por hidrogênio (quatro ligações/molécula), mas que as ligações diferem em ângulo, comprimento e energia. Sustentadores da teoria mista assumem que a água consiste de duas ou mais espécies distintas que existem em estado de equilíbrio dinâmico e diferem em grau de ligações de hidrogênio. Um exemplo de teoria mista é o 'modelo intersticial'. Este propõe que a água líquida existe parcialmente na forma de estruturas que envolvem quatro coordenações em um arranjo aproximadamente tetraédrico das moléculas d'água. Nas cavidades formadas por estas estruturas existem moléculas d'água presas (Schnepf, 1989).

O atual modelo estrutural da água estabelece que as moléculas estão ligadas entre si por ininterruptas pontes de hidrogênio, movendo-se em várias direções, ocupando todo o espaço físico. Muito do comportamento incomum da água resulta da presença destas pontes de hidrogênio decorrentes de interações eletrostáticas na molécula.

Em termos simples, a água é um composto de hidrogênio e oxigênio, um gás combustível e outro que suporta combustão, combinando na razão de dois volumes de hidrogênio para um de oxigênio.



A distância internuclear O - H tem sido determinada como 0,99 Å.

A água pura é um polímero com fórmula  $(\text{H}_2\text{O})_n$ , em que o valor de  $n$  depende das condições ambientais, tais como temperatura e pressão. O valor de  $n$  sempre difere, dependendo da amostra de água tomada, tornando-se mais diferenciado próximo a interfaces do que a grandes distâncias destas e, no caso de soluções aquosas, mais diferenciado próximo a espécies dissolvidas, solutos iônicos e não polares (Horne, 1970).

É geralmente aceito o modelo proposto por Bernal e Fowler, em 1933, de que uma única molécula d'água constitui um tetraedro com o átomo de oxigênio ao centro e os átomos de hidrogênio nas duas extremidades (Echlin, 1992). O átomo de oxigênio ocupa o centro de um cubo incompleto e os hidrogênios os cantos opostos de uma face. Diretamente direcionados para os cantos das faces opostas, a parte mais recuada dos hidrogênios são dois braços de eletrificação negativa. As ligações covalentes OH ligando os dois átomos de hidrogênio com o átomo de oxigênio não estão em linha reta, mas em um ângulo de cerca de  $105^\circ$  (Figura 1). Se a água fosse linear, seria uma substância não polar. Na configuração curva, contudo, o átomo eletronegativo O e os dois átomos H de um dipolo oferecem à molécula característica polar. Além disso, esta estrutura é idealmente apropriada à formação de pontes de hidrogênio.

Cada molécula d'água tem uma média de 4,4 vizinhos situados de centro a centro, em uma distância de 2,84 Å. A possibilidade de formar quatro pontes de hidrogênio por molécula d'água é a fonte de fortes atrações intermoleculares

que dotam uma substância deste peso molecular, que não é metálica nem iônica, com o anômalo alto ponto de ebulição, fusão, calor de vaporização e tensão superficial. A coesão interna desta substância é alta. A chave destas atrações é intrínseca à sua constituição atômica. O fato crucial está na sua habilidade não rivalizada para formar pontes de hidrogênio (Garrett e Grisham, 1995).

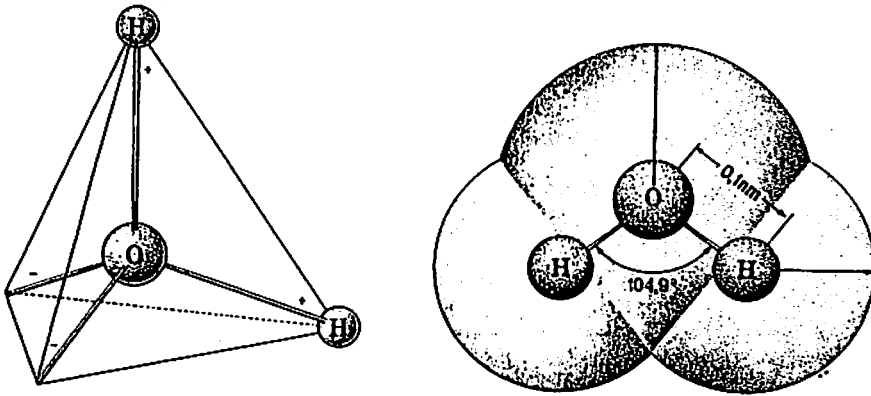


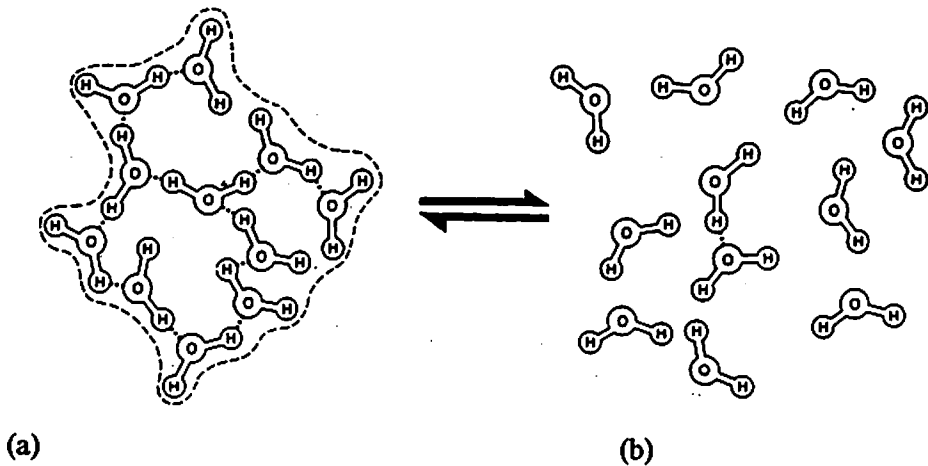
FIGURA 1 Modelo estrutural da água líquida. À esquerda, esquema do dipolo da água; à direita, a forma tridimensional de sua molécula (Junqueira e Carneiro, 1997).

A água pura possui uma rede tridimensional ao acaso, que tem uma preferência pela geometria tetraédrica, mas contém um grande número de pontes de hidrogênio imperfeitas. O tempo médio de vida de uma ligação (ponte de hidrogênio) entre duas moléculas d'água é de 9,5 ps (picosegundos, sendo  $1 \text{ ps} = 10^{-12}$  segundos). Assim, em torno de cada 10 ps, a metade das moléculas d'água



movem-se, reorientam-se e interagem com novas moléculas vizinhas (Garrett e Grisham, 1995).

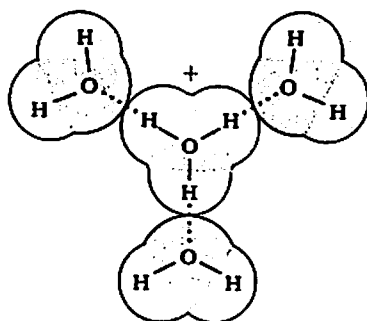
As moléculas d'água no líquido podem estar agregadas (Figura 2) por forças fracas em combinações semi-cristalina,s cujo tamanho e forma dependem das condições físicas em relação ao tempo (Matz, 1965). A formação e quebra dos agrupamentos procede por meio da troca de energia por meio das colisões no limite do agrupamento. À temperatura ambiente, um agregado médio contém cerca de 40 moléculas d'água. Pequenos polímeros tendem a ser raros, por causa da natureza cooperativa do processo de ligação de hidrogênio (Horne, 1970).



**FIGURA 2** Pontes de hidrogênio entre as moléculas d'água resultam em agregações de ordenação semi-cristalina (a). Por causa da contínua agitação térmica, estas agregações têm vida curta e quebram rapidamente para formarem outras muitas configurações ao acaso (b) (Taiz e Zeiger, 1991).

A água pura contém não somente moléculas HOH, mas também muitos outros constituintes em quantidades traço. Em adição aos isótopos comuns  $^{16}\text{O}$  e

$^1\text{H}$ , estão também presentes  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^2\text{H}$  (deutério) e  $^3\text{H}$  (trítio), dando origem a 18 variantes isotópicas da molécula HOH. A água também contém partículas iônicas, tais como íons de hidrogênio (existindo como  $\text{H}_3\text{O}^+$  – Figura 3), íons hidroxil e seus isótopos. A água consiste de mais 33 variantes químicas de HOH, mas estas ocorrem somente em quantidades muito diminutas (Fennema, 1996).

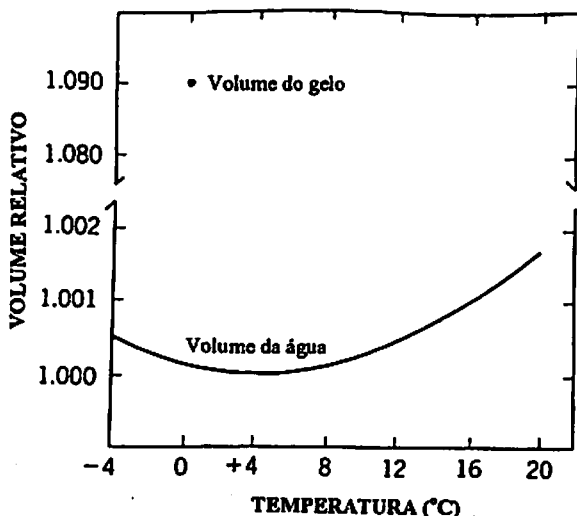


**FIGURA 3** Partícula iônica na água líquida. As linhas sólidas denotam ligações covalentes e as pontilhadas representam pontes de hidrogênio entre o íon hidrônio e a água de hidratação (Garrett e Grisham, 1995).

A estrutura da água pesada,  $(\text{D}_2\text{O})_n$  –um isótopo do hidrogênio chamado deutério que tem um próton e um neutron no núcleo, com resultante número de massa = 2–, é muito similar à da  $\text{H}_2\text{O}$ , apesar de ter maiores frações de pontes de hidrogênio. À temperatura ambiente e abaixo desta, a ligação O-D-O torna-se mais forte do que a ligação O-H-O (Horne, 1970). Esta é levemente mais estruturada do que a água comum; isto quer dizer que a ligação deutério é levemente mais forte do que a ligação de hidrogênio. Assim, muitas de suas propriedades tendem a ter alguns valores numéricos mais elevados (Encyclopaedia Britannica, 1976).

Em comparação com compostos químicos de similar organização atômica e tamanho molecular, a água exibe propriedades anômalas. Isto, comparando a água (um hidreto de oxigênio) com outros hidretos próximos na tabela periódica, nomeados amônia ( $\text{NH}_3$ ) e fluoreto de hidrogênio ( $\text{HF}$ ), ou com o hidreto de gênero próximo, a sulfã ( $\text{H}_2\text{S}$ ) que, à temperatura e pressão normal, existem somente como gases enquanto a água é um líquido. A amônia, tendo um arranjo tetraédrico de três hidrogênios e um sítio receptor, e o fluoreto de hidrogênio, tendo um arranjo tetraédrico de um hidrogênio e três sítios receptores, não têm número igual de doador e receptor e podem formar somente redes bidimensionais por pontes de hidrogênio envolvendo menos ligações de hidrogênio por molécula do que a água (Fennema, 1996). No néon há nove pontes de hidrogênio e este elemento é um gás a temperaturas muito baixas. No metano,  $\text{CH}_4$ , os hidrogênios estão localizados simetricamente em torno do carbono central, não havendo, portanto, dipolo e o metano é também um gás a temperaturas relativamente baixas (Garrett e Grisham, 1995).

A densidade relativamente baixa d'água deve-se ao fato de as pontes de hidrogênio estarem continuamente se quebrando e reformando. Abaixo de  $4^\circ\text{C}$  em pressão atmosférica, a estrutura começa a aumentar mais sistematicamente, e conseqüentemente torna-se mais aberta com o decréscimo da densidade de  $4^\circ\text{C}$  a  $0^\circ\text{C}$  (Némethy, 1966; Taylor, 1969). Neste ponto, se um núcleo cristalino está presente, há uma geração espontânea de uma rede sistemática e o gelo é formado com uma densidade significativamente menor ( $0,917 \text{ g/cm}^3$ ) do que a água ( $0,9998 \text{ g/cm}^3$ ) à mesma temperatura. Esta é uma situação normal. A água raramente está livre de contaminantes. A água altamente purificada, contudo, permanece líquida sob temperatura abaixo de  $-42^\circ\text{C}$  (Taylor, 1969). A mudança no volume não é comum. Enquanto muitas substâncias contraem na passagem ao estado cristalino, a água expande por quase um décimo de seu volume (Figura 4).



**FIGURA 4** Mudanças no volume da água com a variação da temperatura. O volume mínimo dá-se a 4°C. Abaixo desta temperatura há um aumento no volume com a ordenação das moléculas em uma estrutura cristalina (Kramer, 1983).

A viscosidade e o coeficiente de difusão da água são propriedades que determinam a velocidade com que moléculas d'água passam de sua posição temporária ao equilíbrio. Ambas as propriedades são fortemente dependentes da temperatura e têm uma grande influência na cinética de cristalização. A viscosidade da água a 1 atm é dobrada entre 25° e 0°C, mas quando a água é sub-resfriada a -80°C, a uma pressão de 2000 atm, a viscosidade aumenta 1.500 vezes. A viscosidade da água pode ser aumentada também adicionando-se solutos polares. A adição de grandes espécies moleculares, tais como proteínas, também afeta a estrutura da solução aquosa pela ligação da água às superfícies das moléculas dissolvidas e redução da energia livre do sistema (Niklas, 1992; Kramer e Boyer, 1995).

A **condutividade térmica da água** é alta quando comparada com a de outros líquidos e a condutividade térmica do gelo é moderadamente maior quando comparada com a de outros sólidos não metálicos. A condutividade térmica do gelo a 0°C é aproximadamente quatro vezes a da água à mesma temperatura, indicando que o gelo pode conduzir energia térmica a velocidades muito maiores do que a água imobilizada em tecidos (Fennema, 1996).

## 2.2 Interações água-soluto

A água tem uma constante dielétrica (habilidade de neutralizar a atração entre cargas elétricas) que contribui para o seu comportamento como um quase solvente universal. A adição de um soluto reduz o ponto de congelamento porque dilui a água e reduz a pressão de vapor, embora decrescendo a temperatura na qual as fases vapor, líquido e sólido estão em equilíbrio (Kramer e Boyer, 1995).

São três as principais classes de associações entre a água e as moléculas de soluto:

interações iônicas entre a água e a concha de hidratação que circunda cátions e ânions. Ex., solução de NaCl;

interações polares entre a água e solutos não ionizados que são capazes de extensivas pontes de hidrogênio. Ex., solução de sacarose;

associação apolar quando o soluto tem uma baixa solubilidade aquosa e não forma pontes de hidrogênio com a água. Nestas circunstâncias, as moléculas d'água são reorganizadas para formar cavidades em torno das moléculas apolares com os grupos O-H direcionados para o centro da cavidade. Este fenômeno é referido como hidratação hidrofóbica por Franks (1985) e exemplos podem incluir interações entre as moléculas d'água e hidrocarbonos e entre derivados alquila, tais como álcoois, cetonas, ésteres e aminas.



Quando um sólido ionizado é colocado na água, as moléculas do solvente se orientam em torno da superfície dos íons e os atraem, por ação eletrostática, da grade cristalina na qual eles estão presos. O processo é ajudado por uma mobilidade incipiente de átomos superficiais que facilmente são destacados do cristal. Opostamente, íons carregados, em solução, são isolados por suas bainhas de hidratação e isso cria uma barreira à atração eletrostática entre estes. A água tem uma alta constante dielétrica e sabe-se que suas cargas positivas e negativas resistem a um relativo deslocamento quando colocadas em um campo elétrico. Então, quando as moléculas d'água se alinham em torno dos íons solvatados, por sua resistência ao deslocamento, diminui a atração interiônica.

O oxigênio na água é altamente eletronegativo e tem pares de elétrons não compartilhados. Além disso, tendo apenas dois pequenos hidrogênios ligados a ele, o oxigênio está muito exposto; diversos átomos de oxigênio de outras tantas moléculas de água podem agrupar-se cerradamente em torno do cátion sem estorvo mútuo (Figura 5).

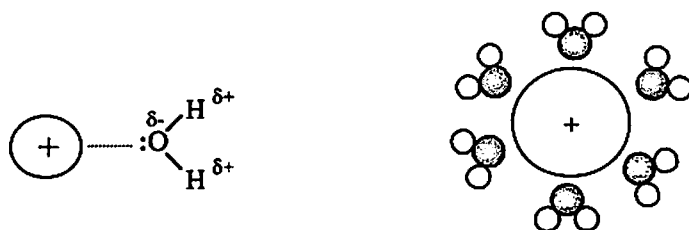


FIGURA 5 Diagramas mostrando a interação da água com moléculas catiônicas (Kramer, 1983).

Por sua vez, os ânions são atraídos para o pólo positivo de uma molécula polar (o hidrogênio torna-se altamente positivo quando ligado a um átomo

como o oxigênio). As ligações íon-dípolo que unem os ânions à água são pontes de hidrogênio. As ligações de hidrogênio permitem uma solvatação particularmente forte dos ânions. Não só existe uma carga positiva forte concentrada num átomo muito pequeno, o hidrogênio, como este se projeta para fora da molécula ficando bem exposto; o ânion pode ser preso por várias ligações de hidrogênio a outras tantas moléculas d'água (Figura 6), sem que elas estorvem umas às outras (Morrison e Boyd, 1983).

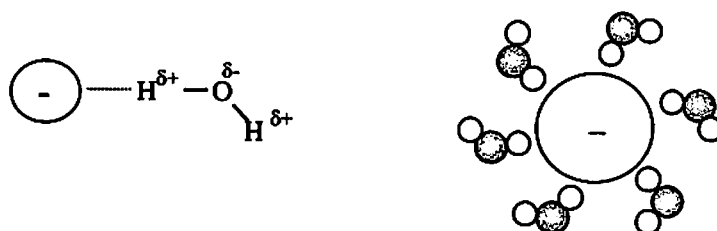


FIGURA 6 Diagramas mostrando a interação da água com moléculas aniônicas (Kramer, 1983).

Solutos capazes de formarem pontes de hidrogênio podem aumentar a estrutura normal da água pura ou não permitir que esta se rompa. Contudo, em alguns casos, a distribuição e orientação dos sítios de ligações de hidrogênio do soluto são geometricamente incompatíveis com os existentes na água normal. A uréia é um bom exemplo de um pequeno soluto com ligações de hidrogênio que, por razões geométricas, tem um marcante efeito destrutivo da estrutura normal da água (Fennema, 1996).

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 de rede (uma solução mais fluida do que a água pura). Outros, porém, têm um efeito formador de estrutura (uma solução menos fluida do que a água pura). 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 e assumem a função de impedir a formação do gelo (Schnepf, 1989).

No caso de compostos não iônicos, mas polares, tais como açúcares, as interações polares entre solvente e soluto são mais fortes do que as atrações intermoleculares entre as moléculas de soluto causadas por forças de van der Waals. Assim, as moléculas do soluto prontamente se dissolvem na água.

Diferentes açúcares interagem de maneira diversa com a água, sendo que as interações de hidratação mais favoráveis são aquelas que envolvem substituintes equatoriais  $-OH$  em açúcares piranoses. Compostos muito similares quimicamente, como, por exemplo, manitol, sorbitol e inositol, mostram comportamentos de hidratação muito diferentes. O mesmo acontece com pentoses, sendo que diferenças marcantes no comportamento da solução foram observadas para os açúcares ribose e xilose. A hidratação preferencial dos grupos equatoriais  $-OH$  tem sido relatada pela compatibilidade de tais grupos com a organização das moléculas d'água no líquido. A distância entre os grupos equatoriais  $-OH$ , no mesmo plano, relativo ao plano das piranoses, é 4,9 Å. Este tipo de estrutura de hidratação, mostrado na Figura 7, pode contar para superiores propriedades crioprotetoras de compostos poliídrol com grupos equatoriais  $OH$ . A distância crítica de 4,9 Å, que iguala a distância da segunda vizinhança na água líquida, é incompatível com a distância de 4,5 Å correspondente no gelo. Açúcares equatorialmente substituídos e polióis podem prevenir a nuclea-

ção do gelo por causa da incompatibilidade entre a geometria da grade cristalina e a estrutura de hidratação do carboidrato (Franks, 1975).

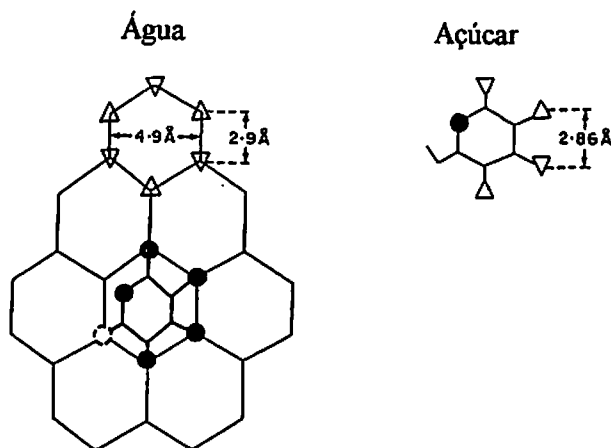


FIGURA 7 Interação de hidratação específica entre o grupo equatorial -OH e a grade cristalina idealizada (Tait et al., 1972), baseada na distribuição radial de raio-x da água a 25°C. As orientações dos triângulos indicam se um átomo de oxigênio está acima ou abaixo do plano do anel do açúcar.

Uma molécula de sacarose (Figura 8) contém oito grupos hidroxil. Três desses grupos e um átomo de oxigênio do anel participam na formação de duas pontes de hidrogênio intramoleculares no estado sólido. Não há evidência que indique que a molécula de sacarose retenha a ponte de hidrogênio intramolecular em solução aquosa. A estabilidade relativa da solução supersaturada indica que há muita difusão e ligações de hidrogênio ao acaso entre a sacarose e as moléculas d'água que impedem a formação do núcleo cristalino. Cada um dos onze átomos de oxigênio na molécula de sacarose é um potencial sítio ligante de hidrogênio com as moléculas d'água. Em soluções diluídas é provável que, em

algum instante, cada molécula de sacarose esteja fortemente associada com um número de moléculas d'água, não excedendo onze, e que essas moléculas estejam em equilíbrio dinâmico com as remanescentes moléculas d'água livres. Quando a concentração de sacarose aumenta, o número de moléculas d'água 'livres' decresce e isto eventualmente leva a uma redução no número de moléculas d'água 'ligadas' à cada molécula de sacarose (Allen, Wood e McDonald, 1974).

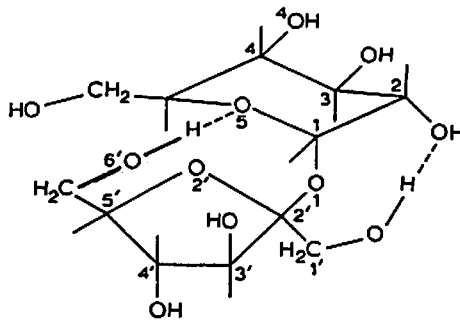
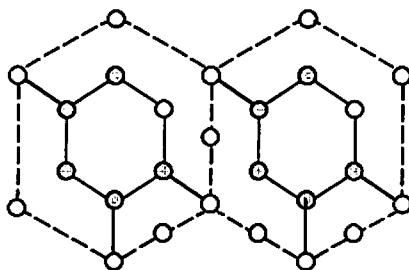


FIGURA 8 Modelo conformacional da molécula de sacarose (Allen, Wood e McDonald, 1974).

A água pode associar-se com a sacarose diferentemente, dependendo da forma ou estado desta. Os vários estados físicos da sacarose podem determinar a mobilidade da água nos sistemas. Tem-se como 80% a concentração máxima deste açúcar onde há formação de gelo (água congelável) com resfriamento abaixo de -35°C. Roos e Karel (1991) sugeriram que neste ponto a água não cristaliza por causa da viscosidade de 10<sup>7</sup> Pa ser o limite para a formação do gelo (Chinachoti, 1993). Soluções concentradas de sacarose contêm somente água de hidratação. Quando a concentração é aumentada, moléculas de sacarose formam

entre si pontes de hidrogênio intermolecular, resultando na formação de agrupamentos de moléculas de sacarose na água.

A mobilidade da água em soluções de glicose ou maltose decresce por causa das interações água-açúcar que se estendem além da primeira camada de hidratação. A quantidade de água interativa varia significativamente de açúcar para açúcar. Não somente o número de grupos  $-OH$  nas moléculas de açúcar mas também suas posições (ou configuração molecular do açúcar) têm um importante papel (Suggett, 1976). Os grupos  $OH$  da glicose na configuração equatorial encaixam no arranjo tetraédrico-quaternário das moléculas d'água no estado líquido (Portmann e Birch, 1995) e na grade cristalina do gelo (Figura 9), cujas dimensões são levemente expandidas em relação aos espaços  $O-O$  observados na água líquida à temperatura ambiente. Em soluções congeladas, as hidroxilas do açúcar não estão disponíveis para ligar o hidrogênio eficientemente na grade cristalina e sua estrutura de hidratação pode inibir o crescimento de grandes cristais (Suggett, 1975). Alguns solutos de estrutura muito similar mas diferente configuração podem dar lugar a comportamentos muito diferentes em soluções aquosas (Chinachoti, 1993).



**FIGURA 9** Ligações das moléculas de glicose na superfície do gelo hexagonal. As linhas contínuas são ligações intramoleculares e as pontilhadas formam a grade cristalina. (⊙) Átomos na molécula do açúcar; (⊙) átomos do açúcar na grade cristalina; (○) moléculas d'água na grade cristalina (Cameiro, 1997).

A  $\alpha,\alpha$ -trealose tem um dos mais altos números de hidratação. Os grupos OH estão em posição equatorial (Figura 10), o que promove o estabelecimento de pontes de hidrogênio lineares entre o soluto e o solvente levando à estabilização de sua hidratação por meio da organização das moléculas d'água em uma estrutura de pequenos cristais unidos. Em solução aquosa a  $\alpha,\alpha$ -trealose adota, predominantemente, a conformação dobrada encontrada no cristal. Esta conformação aumenta a disponibilidade de dois tipos de grupo hidroxil (OH)<sub>6</sub> e (CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> para estabelecer pontes de hidrogênio com a água (Portmann e Birch, 1995).

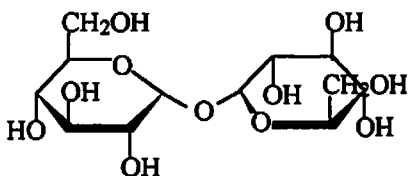


FIGURA 10 Estrutura química da  $\alpha,\alpha$ -trealose.

A arabinose é uma pentose que é encontrada tanto como furanose quanto como piranose nos polissacarídeos vegetais, sendo a furanose a forma mais comumente encontrada (Carpita e Gibeau, 1993). Arabinoxilanas que interferiram com o crescimento de cristais de gelo foram purificadas de centeio e trigo. Um exame da cinética de congelamento mostrou que o material do centeio interagiu fortemente com a interface gelo-líquido e alterou significativamente a cinética de congelamento, tendo pouco efeito no ponto de congelamento. Experimentos de caracterização indicaram que um polissacarídeo contendo arabinose e xilose foi o componente ativo. Este polissacarídeo consiste de uma cadeia de xilanas que está atada a cadeias laterais que contêm um único resíduo terminal

de arabinose como furanose. A razão xilose:arabinose é maior nas frações ativas de trigo, sendo estas mais facilmente deslocadas da interface água-gelo. O polisacarídeo do centeio é um melhor inibidor do crescimento do cristal de gelo do que o polissacarídeo do trigo e difere estruturalmente dos polissacarídeos do trigo por ter mais cadeias laterais e por ser levemente maior em tamanho. Se a xilose está presente nas cadeias laterais não foi estabelecido (Kindel et al., 1989).

Foram estudadas arabinoxilanas solúveis em água com diferentes massas moleculares, mas similares graus de ramificação. Com relação à viscosidade e  $T_g$  do sistema, diferenças relacionadas à massa molecular seguiram diferentes caminhos, uma vez que os efeitos da massa molecular (melhor potencial crioprotetor associado a maior massa) podem contrabalancear aqueles relacionados ao grau de ramificações (Fessas e Schiraldi, 2001).

Açúcares, como a sacarose e a trealose, e grandes oligossacarídeos, tais como a rafinose e a estaquiase, têm sido encontrados acumulados em grande quantidade em muitos organismos tolerantes à dissecação (Crowe, Crowe e Chapman, 1984; Crowe et al., 1988). Esses resultados sugerem que os carboidratos podem estar envolvidos na aquisição de tolerância ao congelamento. O efeito protetor dos açúcares parece ser uma função da concentração e do peso molecular. Em base molar, os trissacarídeos são mais efetivos do que os dissacarídeos e estes mais do que os monossacarídeos. Açúcares solúveis são grandes agentes vitrificantes em sistemas binários, tal que o efeito dos açúcares pode ser associado com a vitrificação citoplasmática (Koster e Lynch, 1992). Ou, ainda, os carboidratos podem substituir a água, mantendo a estrutura hidrofílica em sua orientação hidratada sempre após a água ter sido removida. Assim, a fusão dos grupos polares e, conseqüentemente, a transição de fase da membrana a gel são evitadas (Santos, 1999).



Em solução de açúcares + 0,4% de goma guar, núcleos de gelo foram inicialmente formados, mas sua propagação não pode ser sustentada. A velocidade de propagação não foi tão rápida para que os cristais atingissem o raio crítico. As unidades de crescimento na superfície do cristal, representadas pelo número de sítios ligantes, governam a propagação dos cristais de gelo. As moléculas d'água tornam-se firmemente ligadas à grade cristalina se estas atarem-se a cada sítio, caso contrário irão provavelmente retornar ao fluido (Wang, Barringer e Hansen, 1998). Quando a goma está presente o crescimento torna-se mais difícil. Neste caso, o efeito observado da goma guar pode ser o de promover uma modificação física nos sítios ligantes dos cristais. A Figura 11 mostra a incorporação da goma guar retardando o crescimento do cristal, embora a retardação tenha sido muito menor a  $-3^{\circ}\text{C}$ . À temperatura de resfriamento há uma grande força motriz que torna mais rápida a nucleação do gelo. Isto indica que o efeito da goma guar na cristalização do gelo é maior quando a força motriz de cristalização é mais fraca (menor gradiente de temperatura).

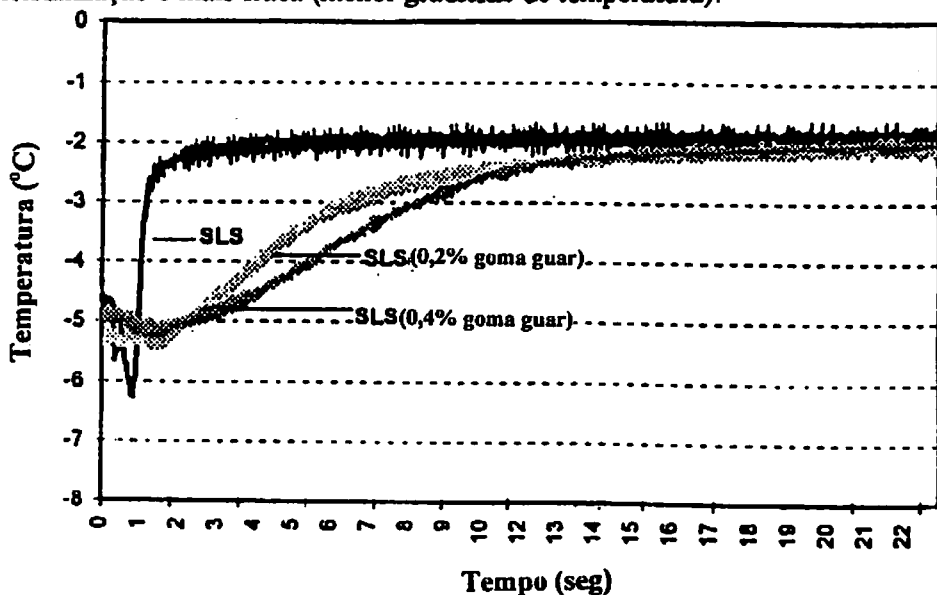


FIGURA 11 Perfis da cristalização da água em soluções de sacarose-lactose (SLS) com goma guar (Wang, Barringer e Hansen, 1998).

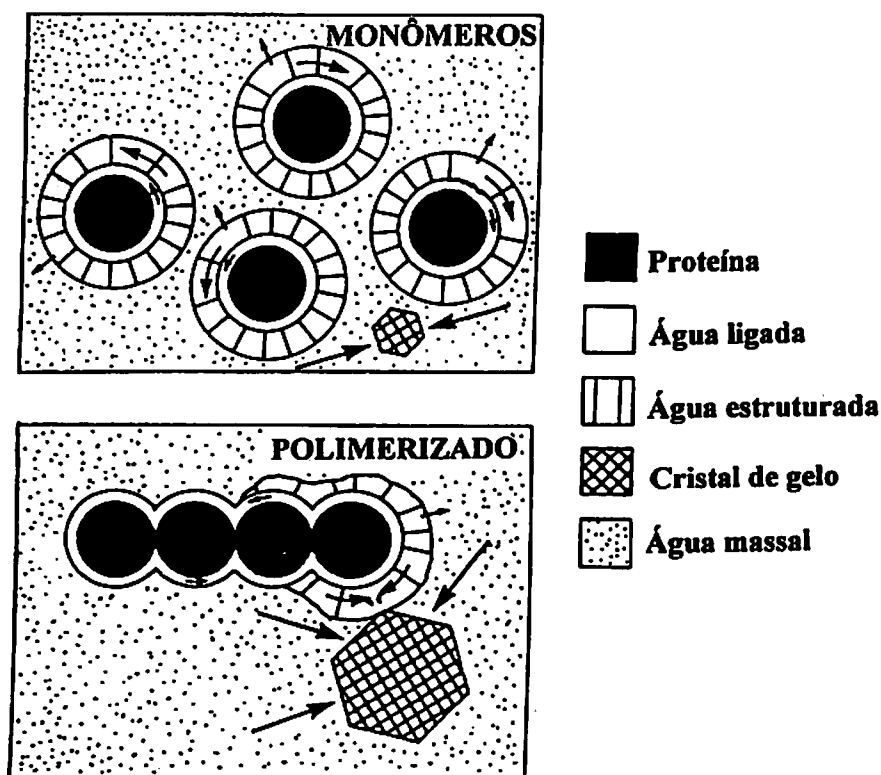
A viscosidade sozinha não é um fator de controle para a inibição da propagação dos cristais de gelo; a transferência de calor e a modificação dos sítios ligantes podem influenciar (Wang, Barringer e Hansen, 1998).

Tem sido observado que grupos hidrofílicos em muitas macromoléculas cristalinas estão separados por distâncias idênticas ao espaçamento dos oxigênios próximos na água pura. Se este espaçamento prevalece nas macromoléculas hidratadas isto pode encorajar pontes de hidrogênio cooperativas na primeira e segunda camada d'água.

Não há um termo universalmente aceito para descrever a hidratação de proteínas ou de espécimes biológicas. Em uma destas descrições a água está classificada como: 1) água massal – as moléculas d'água estão tão distantes da superfície do soluto que sua mobilidade molecular é determinada somente por interações características das moléculas d'água entre si; 2) água de hidratação – todas as moléculas d'água cuja mobilidade é influenciada pela água massal; 3) água ligada – as moléculas d'água estão ligadas por duas ou três pontes de hidrogênio a sítios fixos polares e esses ligados a sítios iônicos nas proteínas; 4) água estruturada – as moléculas d'água estão menos influenciadas quanto a mobilidade do que a água ligada, mas são ainda influenciadas em estrutura pela água massal (Cameron, Hunter e Fullerton, 1988). Considerando que algumas das moléculas d'água na superfície das proteínas estão ligadas não rotacionavelmente, então, a incorporação posterior de moléculas d'água à superfície deve consistir de água estruturada, como ilustrado na Figura 12 (Cameron, Hunter e Fullerton, 1988).

Sabe-se que um aumento na concentração, pela cristalização d'água, dos materiais dissolvidos afeta colóides, tais como proteínas, que podem ser desnaturadas e afetar desfavoravelmente sua capacidade de ligação com a água. Proteínas e outros polímeros podem absorver grandes quantidades d'água após o descongelamento. Esta é uma das razões pelas quais a água contendo materiais

dissolvidos exsuda, juntamente com estes materiais, dos produtos descongelados. A localização do aminoácido polar é também um fator para a interação água-proteína já que este é mais facilmente ligado à água se a carga estiver localizada na superfície e não dentro da molécula (Schnepf, 1989). Muitos dos aminoácidos 'livres' nas células parecem não estar totalmente livres, mas existem em frações 'ligados e livres' (Clegg, 1988).



**FIGURA 12** Modelo do efeito da agregação macromolecular no tamanho dos cristais de gelo. A distância que uma molécula d'água pode migrar em um determinado tempo é indicada pelo comprimento das setas. A agregação aumenta a superfície que permite à água mais estruturada migrar para um cristal de gelo em crescimento e não vitrificar. Isto promove cristais de gelo maiores durante o congelamento por imersão (Cameron, Hunter e Fullerton, 1988).

Uma grade cristalina 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.

Proteínas anticongelantes (AFPs) alteram o hábito de crescimento do gelo em solução aquosa, induzindo faces não basais. A adsorção ao gelo é cristalograficamente específica e ocorre em diferentes faces não basais, dependendo da proteína em particular. As moléculas de proteínas anticongelantes são vistas como partículas atadas firmemente ao gelo, não migrando na superfície (Knight e DeVries, 1994). A habilidade destas proteínas para inibir a velocidade de crescimento ao longo do eixo *a* de um cristal de gelo sugere que a AFP pode ligar-se aos planos prismáticos, perpendiculares aos eixos *a* (Figura 13). Similarmente, a inibição da velocidade de crescimento do eixo *c* reflete a ligação da AFP aos planos basais (Chakrabartty e Hew, 1991).

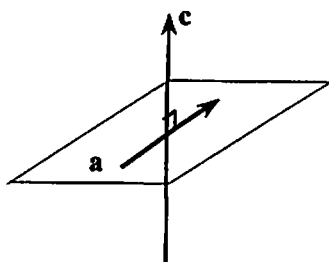


FIGURA 13 Representação dos eixos *a* (basal) e *c* (normal ao plano).

Alguns autores (DeVries, 1984; Knight, Cheng e DeVries, 1991) sugerem que as AFPs são alinhadas de modo a emparelhar o espaçamento de resíduos polares com a rede cristalina em um plano particular. Para uma molécula que tem um 'lado hidrofóbico' e um 'lado hidrofílico', o mecanismo mais aceito

para a inibição do crescimento do cristal de gelo envolve adsorção do lado hidrofílico da molécula na superfície do gelo, que resulta na exposição do lado hidrofóbico à solução. Assim, o crescimento do cristal seria prevenido por exclusão hidrofóbica das moléculas d'água da superfície do cristal (Sönnichsen et al., 1996). Outros autores (Drewes e Rowlen, 1993) discordam desta teoria pelo fato da estrutura  $\gamma$  não ter o lado hidrofóbico exposto ao solvente. Eles sugerem que a adsorção das AFGPs na superfície do gelo no comprimento de um longo pep-tídeo pode suficientemente alterar a superfície de um cristal de gelo, tal que as moléculas d'água não possam se ordenar na superfície de maneira a promover o crescimento do cristal. Ou, ainda, supõe-se que, sendo as moléculas d'água tão pequenas e tão móveis, a inibição do crescimento do cristal de gelo pode ser um efeito da contração da superfície deste, tal que o crescimento 'local' requer um aumento na energia livre (Knight, Cheng e DeVries, 1991; Knight, Driggers e DeVries, 1993).

O crescimento do gelo em soluções concentradas de proteínas anticongelantes dá-se na forma de espículos, ou fibras, paralelas ao eixo c. Para a mistura de AFGPs, à concentração de 1% por peso ou mais, uma estrutura fibrosa torna-se evidente (Knight, DeVries e Oolman, 1984). Uma proteína anticongelante tipo AFP(KE)<sub>2</sub> pode ter uma maior afinidade pelo gelo do que uma AFP nativa. Uma razão para esta maior afinidade é que este peptídeo tem adicional lisina e glicina nas cadeias laterais para ligar à superfície do gelo (Chakrabarty e Hew, 1991). Estudos têm mostrado que as glicoproteínas e os peptídeos são capazes de proteger a integridade estrutural de membranas e limitar a perda iônica (Lillford e Holt, 1994).

Aminoácidos, tais como a arginina e prolina, frequentemente são acumulados em plantas em resposta à aclimatação ao frio (Koster e Lynch, 1992). Tem sido proposto que os aminoácidos desempenham um papel não somente na estocagem de nitrogênio, mas também em combinação com açúcares, na prote-

ção contra injúrias pelo congelamento (Sakai e Larcher, 1987). Outros compostos associados à aclimatação de plantas são ácidos graxos insaturados.

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).

A formação de uma solução contendo água e substâncias não polares é acompanhada por uma mudança negativa de entropia, que é desfavorável, e que é predominante. Esta mudança corresponde à redução da desordem, isto é, a formação da mesma estrutura tendo mais regularidade do que antes da mudança. Esta ordenação ocorre por meio da mudança estrutural da água que aumenta em torno do soluto (Némethy, 1966). Já que solutos não polares devem ocupar espaço, as ligações de H ao acaso devem reorganizar-se para acomodá-los. Ao mesmo tempo, as moléculas d'água participam em muitas interações umas com as outras (Garrett e Grisham., 1995). Colóides modificam a estrutura da água pela organização das moléculas em torno destes, produzindo uma curta faixa ordenada que é diferente da estrutura tetraédrica normal. As forças que promovem a solvatação na água podem operar também em moléculas ou agregados moleculares que são muito grandes para formarem uma solução verdadeira (Taylor, 1969; Simatos e Turc, 1975; Chou e Morr, 1979; Gossett e Baker, 1983). Se dois grupos apolares separados estão presentes, o ambiente aquoso incompatível irá encorajar a associação dos mesmos (Figura 14). Desse modo, reduzindo o contato com a água, um processo que é termodinamicamente favorável (Fennema, 1996).

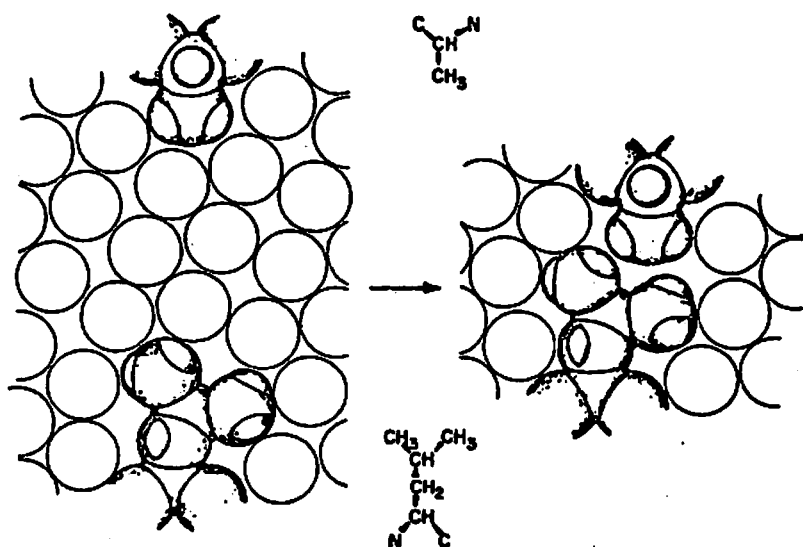
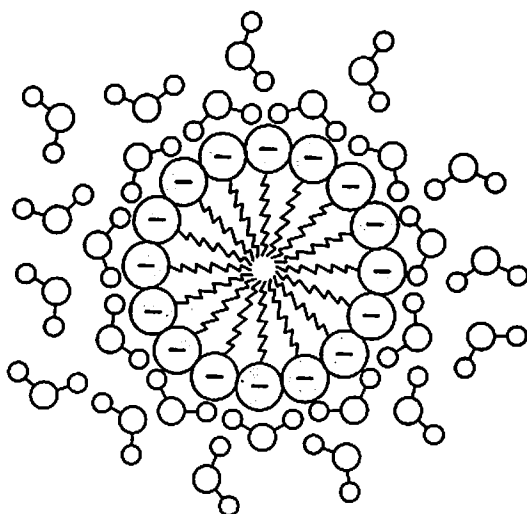


FIGURA 14 Ilustração esquemática da interação hidrofóbica entre duas cadeias laterais expostas (Némethy, 1966).

A altas concentrações, grupos hidrofóbicos interagem. Em tais casos, moléculas hidrofóbicas procuram formar um núcleo micelar esférico. Com isto, a interação água/grupos hidrofóbicos torna-se mínima, assim como o número de pontes de hidrogênio por unidade de volume (Luck, 1981). Muitas moléculas com estruturas em anel, tais como purinas e pirimidinas, são somente levemente solúveis em água ou solventes orgânicos. Moléculas destas substâncias, que contêm regiões polares e não polares (Figura 15), preferem nenhum tipo de solvente e aderem fortemente umas às outras em cristais sólidos (Metzler, 1977).



**FIGURA 15** Formação de micela por moléculas anfifílicas em soluções aquosas. Por causa de sua superfície carregada negativamente, as micelas repelem as outras vizinhas e se mantêm na solução com relativa estabilidade (Garrett e Grisham, 1995).

Outro exemplo de interação entre a água e grupos hidrofóbicos é a formação de hidratos clatratos. Um hidrato clatrato é composto de uma inclusão tipo gelo dentro da água líquida. A substância ‘hospedeira’ forma por pontes de hidrogênio, uma estrutura tipo gaiola que prende fisicamente uma pequena molécula apolar, conhecida como ‘hóspede’ (Figura 16). Interações entre água e a substância hóspede são fracas, comumente envolvendo nada mais do que fracas forças de van der Waals (Meyer, 1960; Franks, 1975; Garrett e Grisham, 1995; Fennema, 1996). A água considerada substância ‘hospedeira’ estabelece ligações de hidrogênio envolvendo 20 a 74 moléculas d’água. Estes cristais clatratos podem crescer até tamanhos visíveis, sendo alguns deles estáveis a tempe-



raturas superiores a 0°C. As substâncias hóspedes são compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos, gases raros, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, álcool etílico, aminas, etc. (Franks, 1975). A orientação tipo clatrato pode possivelmente persistir na segunda ou terceira camada da água, formando uma longa faixa, mas uma concha de hidratação altamente lábil.

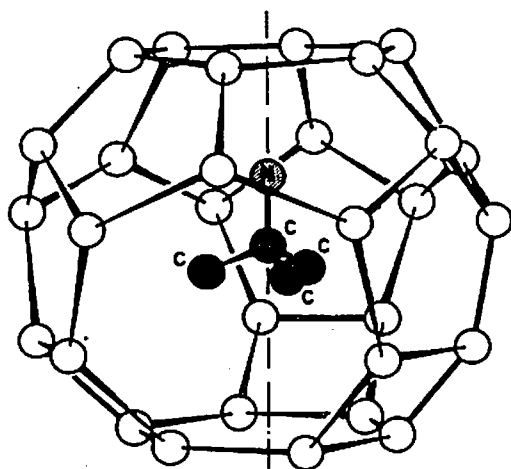


FIGURA 16 Ilustração esquemática de um hidrato clatrato mostrando a estrutura tipo cavidade capaz de acomodar moléculas hóspedes. (Franks, 1975).

Proteínas no soro de leite afetam a velocidade de crescimento dos cristais de gelo afetando assim a estrutura microscópica da superfície. Por exemplo, se a velocidade de crescimento dos cristais de gelo decresce devido à presença das proteínas do soro, a superfície pode tornar-se lisa (Hartel e Chung, 1993).

## **2.3 Fenômenos decorrentes da remoção de calor do sistema**

O congelamento da água líquida envolve três processos distintos: remoção de calor (sub-resfriamento), nucleação e crescimento do cristal.

### **2.3.1 Sub-resfriamento**

O termo **água sub-resfriada** refere-se à água que permanece líquida abaixo do ponto de congelamento sem nucleação e consequente cristalização. Embora amostras tão grandes quanto 1 ml sejam observadas, ainda permanecerem líquidas a  $-30^{\circ}\text{C}$ , a água sub-resfriada torna-se progressivamente mais difícil de observar quando a amostra aumenta em tamanho e decresce em pureza e temperatura, por aumentar a probabilidade de nucleação.

Quando um líquido esfria, a vibração (movimento térmico de Brown) de seus átomos devido ao calor decresce e seu arranjo espacial torna-se menos aberto. As moléculas d'água se aproximam e a força de atração que as une se acentua. Uma constante contração no volume do líquido acontece. As baixas temperaturas no ambiente imediato aos espécimes provocam um declínio térmico e removem a energia térmica até que o espécime esteja em equilíbrio com o meio. No ponto de congelamento, um líquido que cristaliza libera calor (calor de cristalização; a energia requerida para manter os átomos no estado líquido é maior do que a energia requerida para manter os mesmos átomos no estado cristalino) com uma redução no volume total quando os átomos são rearranjados em cristal. Em posterior resfriamento, o cristal contrai mais lentamente porque mudanças não tomam mais lugar na configuração dos átomos, embora as vibrações atômicas, térmicas ou caloríficas continuem. A energia livre disponível no líquido sub-resfriado é menor do que a energia livre disponível em outra estrutura na qual os átomos possam arranjar-se sozinhos e, assim, a estrutura sub-resfriada não irá mudar sozinha. É necessária uma energia para isto e esta

pode permanecer em um estado precariamente estável, que é chamado metaestável, até esta energia ser suprida (Echlin, 1992; Zaritzky, 1997).

Metaestável significa que o sistema está em um estado de energia mais elevado do que o correspondente ao estado de equilíbrio global sob as mesmas condições de pressão, temperatura e composição e que a conversão espontânea para uma energia inferior é improvável.

A água em pequenas gotas e finos filmes e camadas, quando rapidamente resfriadas, são primeiramente sub-resfriadas e, na ausência de algum agente nucleante, transformadas em um estado cristalino ou vítreo. A transformação de fase d'água é acompanhada da liberação de grande quantidade de energia (uns 336 kJ/kg), o que se explica pela redução de energia cinética das partículas da estrutura dos cristais sólidos em comparação com a fase líquida (Gruda e Postolski, 1981).

Pesquisas têm demonstrado que a cristalização de um líquido é improvável sem ocorrer anterior sub-resfriamento, embora insignificante. Partículas maiores do que 2  $\mu\text{m}$  em diâmetro não necessitam de sub-resfriamento para seu crescimento. O sub-resfriamento pode, às vezes, ser observado em tecidos vegetais resfriados a uma velocidade de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  (Fennema e Powrie, 1964). Alguns frutos e vegetais rasteiros podem ser congelados sem sub-resfriamento, como foi observado por Guegov (1972) durante o congelamento de uvas estocadas Popmarinov (1964) observou que frutos podem ser sub-resfriados de  $-5^\circ$  a  $-6,5^\circ\text{C}$ . A baixas velocidades de resfriamento, os cristais de gelo não se formam em maçãs ainda que de  $-5^\circ$  a  $-8^\circ\text{C}$  e em uvas não antes de  $-7^\circ\text{C}$  (Golovkin e Tschernichev, 1967).

Há um menor limite predizível na estabilidade de cada sistema líquido chamado de temperatura de nucleação homogênea do gelo onde este se forma espontaneamente. Fletcher (1970) desenvolveu uma relação entre a velocidade

de nucleação homogênea ( $J$ ) e o grau de sub-resfriamento da água baseado na teoria de transição de fase (ou nucleação). A equação define  $J$ :

$$J = 10^{27} \exp(\Delta G^*/KT), \quad (1)$$

Em que  $\Delta G^*$  é a mudança total em energia livre na formação de um agregado tipo gelo de tamanho crítico. Para cada grau de sub-resfriamento próximo à temperatura de nucleação homogênea há um aumento de 10 vezes em  $J$ .

De acordo com a teoria da nucleação homogênea, a água pode ser sub-resfriada até  $-41^\circ\text{C}$ . Abaixo desta temperatura, a água pura não pode permanecer líquida (Fennema e Powrie, 1964; Quervain, 1975). O sub-resfriamento de gotas d'água pode ir até  $-25^\circ$  a  $-33^\circ\text{C}$  (Smith, 1962; Fennema e Powrie, 1964). A água sub-resfriada não pode existir em estado de equilíbrio com cristais de gelo (Smith, 1962).

Sakai e Larcher (1987) consideram que as seguintes condições devem existir para que ocorra o sub-resfriamento em sistemas biológicos:

1. pequeno tamanho da amostra;
2. pequenos espaços intercelulares para reduzir a nucleação;
3. baixo conteúdo d'água;
4. ausência de nucleantes intracelulares;
5. barreiras opostas à nucleação extracelular;
6. compartimentalização em pequenas unidades, que podem congelar independentemente;
7. a presença de compostos que deprimem a nucleação.

Tais condições são comumente encontradas em organismos aclimatados para viverem a baixas temperaturas (Ashworth, 1990; Griffith et al., 1992; Koster e Lynch, 1992; Hon et al., 1995). Soluções extracelulares exibem vários



graus de sub-resfriamento dependendo da efetividade de nucleantes disponíveis e da natureza das superfícies que circundam a água.

### 2.3.2 Nucleação

Em 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. Neste ponto, o calor é removido mais rapidamente do que é produzido o calor de cristalização. Tão logo estes atinjam um tamanho crítico, sua solubilidade torna-se menor do que a dos grupos transitórios menores, seu crescimento é favorecido absorvendo o soluto circundante e 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.

Para um pequeno núcleo de gelo, o raio de sua superfície (ao longo do eixo  $a$ ) em relação ao seu volume é tão grande que, abaixo de um número crítico de moléculas, a energia livre é maior no núcleo do que no fluido. O crescimento começando do tamanho crítico é afetado espontaneamente pelo decréscimo da energia livre com a adição de moléculas d'água e aumenta a velocidade de crescimento (Figura 17). Com o passar do tempo, os cristais de gelo assumem 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. O equilíbrio termodinâmico é restabelecido quando se forma uma quantidade crítica de núcleos, causando liberação de calor latente. Este processo, referido como crescimento, amadurecimento ou recristalização dos núcleos, é comum a todos os alimentos.

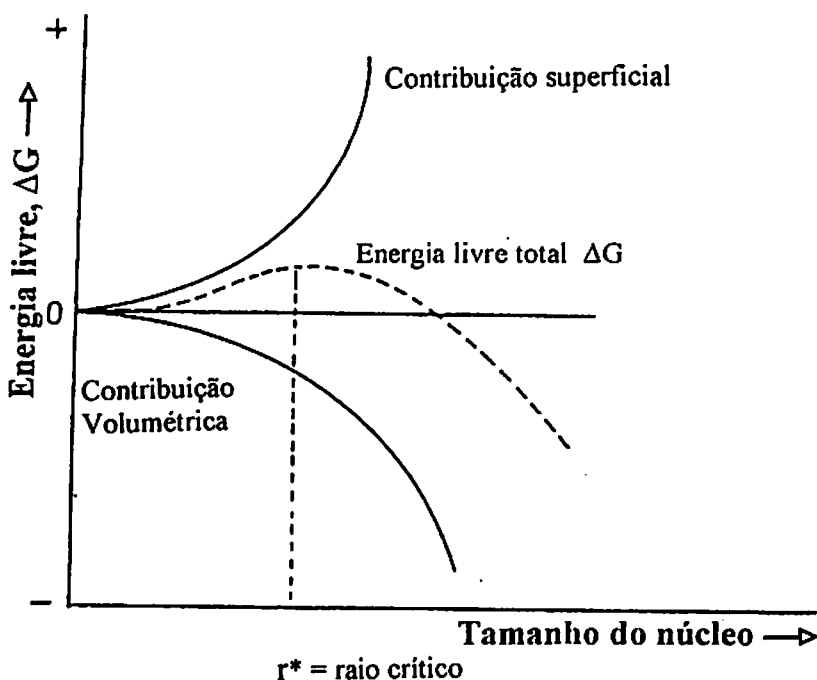


FIGURA 17 Efeito do raio do 'embrião' na energia livre  $\Delta G$  (Zaritzky, 1997).

A nucleação homogênea resulta de flutuações locais ao acaso na densidade e configuração da água pura dando chance à ocorrência espontânea de regiões, havendo orientação e dimensão tipo cristal. A influência do volume e do tempo pode ser explicada por ser a nucleação um fenômeno essencialmente estatístico, e a probabilidade do evento depender do número de indivíduos participantes e da duração do fenômeno.

A intensos sub-resfriamentos, 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 na solução ou pela estrutura superficial do recipiente contendo a mesma. O sub-resfriamento reque-

rido para a nucleação heterogênea depende da natureza e estrutura das impurezas e das concentrações das soluções. Na ausência de gelo incipiente, a água pura tem que ser resfriada a temperaturas de até  $-39^{\circ}\text{C}$ , temperatura de nucleação homogênea (Quervain, 1975). A nucleação heterogênea ocorre a temperaturas mais altas, no caso da água, com um resfriamento de  $0^{\circ}\text{C}$  é possível a formação de gelo. Um terceiro mecanismo de nucleação é denominado nucleação secundária e se produz sempre que há, previamente, cristais do mesmo material na solução.

Quanto maior for a intensidade do sub-resfriamento, maior será a intensidade de nucleação. Quando o congelamento é rápido, a propagação dos cristais formados inicialmente não libera energia suficiente para compensar a taxa de remoção de calor, o que resulta na continuidade do sub-resfriamento e na elevação do número de núcleos formados (Reid, 1983, Monzini e Maltini, 1984).

A probabilidade de nucleação é dependente do volume da amostra, o que significa que se o volume da amostra é pequeno, a probabilidade de formação de embriões é baixa e requer altos sub-resfriamentos (Zaritzky, 1997). A sobrevivência ou não do núcleo é diretamente proporcional à tensão interfacial e à temperatura de congelamento e inversamente proporcional ao calor latente de fusão, à densidade do gelo e ao grau de sub-resfriamento do sistema (Lerici e Pallotta, 1972). Segundo Charm (1971), no sistema água-gelo, a  $-50^{\circ}\text{C}$ , o raio crítico é de cerca de  $10^{-3} \mu\text{m}$  e a  $-5^{\circ}\text{C}$  é de cerca de  $10^{-2} \mu\text{m}$ .

Solutos adicionados podem afetar a nucleação e propagação do gelo. Os efeitos dos solutos adicionados na temperatura de nucleação são similares para nucleação homogênea e heterogênea, enquanto que o efeito da temperatura na velocidade de nucleação difere para ambas (Charoenrein, Goddard e Reid, 1991).

Zasytkin e Lee (1999) estudaram o emprego de nucleadores de gelo extracelular em soluções de sacarose e emulsões a  $-7^{\circ}$  e  $-12^{\circ}\text{C}$ . Os nucleadores

aumentaram a temperatura de nucleação do gelo e reduziram o tempo de sub-resfriamento. Embora o tempo para a transição de fase tenha aumentado na presença de nucleadores, o tempo total de congelamento decresceu.

Células uniformes com grandes vacúolos e dimensões não superiores a 50  $\mu\text{m}$ , sem grandes espaços intercelulares, isoladas por uma forma de barreira ao gelo (parede ou membrana celular) são estruturas, em princípio, capazes de intensos sub-resfriamentos (Schneider, 1972). Pode-se antecipar que as células vivas promovem muitos sítios para nucleação heterogênea da água celular a temperaturas mais elevadas do que  $-38^{\circ}\text{C}$ . Contudo, MacKenzie, Rasmussen e Macaulay (1973) reportam que estruturas tipo gelo necessárias à nucleação heterogênea geralmente não existem em células vivas e que o citoplasma comporta-se como uma solução aquosa diluída. Experimentos mostram que células individuais de leveduras podem ser subresfriadas a  $-37^{\circ}\text{C}$  (Burke, George e Bryant, 1975) e a nucleação do gelo em kiwi ocorre entre  $-2,5^{\circ}$  e  $-5^{\circ}\text{C}$ , dependendo do tecido, os valores mais baixos são reportados para a pele do fruto (Testolin e Costa, 1995).

### **2.3.3 Mudança de fase a baixas e superbaixas temperaturas**

Escala de temperatura, de acordo com Rey (1959) e Smith (1954, 1962):  
temperatura normal: 20 a  $0^{\circ}\text{C}$ ;  
temperatura baixa: de 0 a  $-70^{\circ}\text{C}$ ;  
temperatura superbaixa:  $-70$  a  $-273^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.3.3.1 Cristalização**

As propriedades que relatam o processo envolvido na conversão d'água em gelo devem-se à presença de pontes de hidrogênio que afetam a energia



química interna da molécula ou às propriedades do solvente que relatam o processo pelo qual a água se associa com outras moléculas.

O crescimento de cristais de gelo se deve à migração das moléculas d'água para o núcleo existente, sendo um evento ao acaso iniciado pela nucleação de um único cristal de gelo. Este crescimento depende do grau de suprimento de moléculas d'água na fase líquida e da remoção do calor latente livre (Fennema e Powrie, 1964). A força motriz de cristalização é a diferença entre a energia livre mais alta nas moléculas do líquido envolvente do que no corpo do cristal. A cristalização libera calor latente (cerca de  $25 \text{ kJmol}^{-1}$ ) que aquece a água em direção ao seu ponto de fusão. Quando energia suficiente tem sido removida do sistema, os cristais tornam-se mais estáveis e espontaneamente atuam como sementes para futura cristalização. Futuro resfriamento a temperaturas acerca de  $-135^\circ\text{C}$  (temperatura de recristalização) irá parar o crescimento do cristal (Roos e Morgan, 1990).

Na remoção de calor sensível é retirada somente  $1 \text{ cal/g}^\circ\text{C}$ , enquanto que na cristalização devem ser retiradas  $79,7 \text{ cal}$  por cada grama de gelo formado. A temperatura aumenta rapidamente para o verdadeiro ponto de congelamento ( $0^\circ\text{C}$ ). Após completa solidificação, a futura remoção de calor resulta no decréscimo em temperatura a uma velocidade de aproximadamente  $1 \text{ grau}$  por cada  $0,5 \text{ cal}$  removida por grama de gelo.

A água, com suas forças moleculares direcionadas tetraedricamente, cristaliza-se em uma estrutura aberta (baixa densidade), elucidada por estudos envolvendo raios-x, neutrons, difração de elétrons, infravermelho e espectroscópio de Raman (Lehninger, 1970). No gelo, as ligações de hidrogênio formam uma malha tridimensional. Estas ligações são direcionadas e retas; isto é, os átomos de hidrogênio se ligam em uma linha direta entre dois átomos de oxigênio (Figuras 18 e 19).

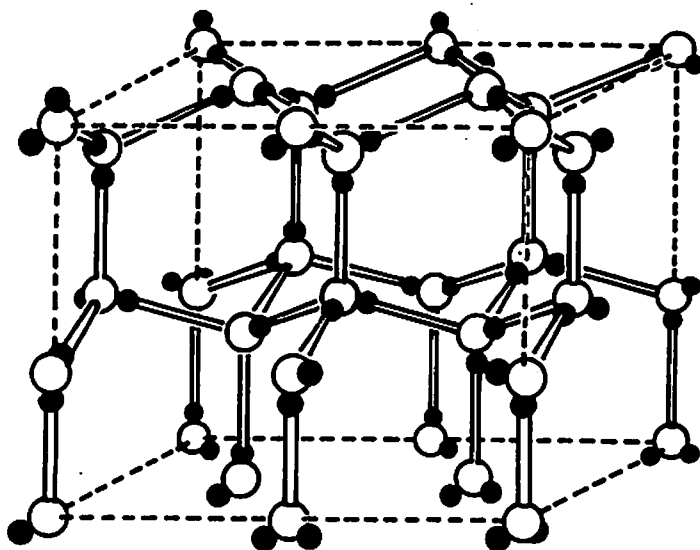
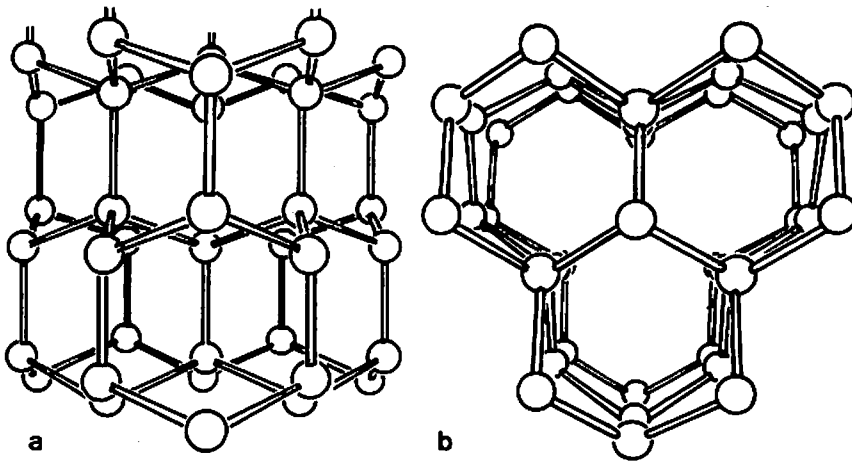


FIGURA 18 Estrutura do cristal de gelo hexagonal (Fletcher, 1970).

Esta linearidade e direcionamento fazem com que as pontes de hidrogênio sejam fortes. Uma importante característica desta estrutura são os espaços abertos que contam para o fato do gelo hexagonal ser menos denso do que o líquido do qual este é formado. O gelo tem um número de coordenação relativamente baixo, com largos espaços vazios.

Se uma molécula d'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. Portanto, o crescimento radial, perpendicular ao eixo  $c$ , é preferido. A temperatura e a extensão do sub-resfriamento influenciam este mecanismo e regem o hábito do cristal (Quervain, 1975).



**FIGURA 19** Arranjo dos átomos de oxigênio no gelo hexagonal. a) Vista perpendicular do eixo c; b) vista ao longo do eixo c mostrando a estrutura aberta do gelo (Hobbs, 1974 citado por Echlin, 1992).

Em sistemas biológicos, a presença de membranas celulares interferem substancialmente com o curso normal da cristalização inicial nas células (Smith, 1954). Na temperatura eutética, o gelo está impossibilitado de coexistir com a solução salina concentrada. Se no congelamento as paredes celulares permanecem intactas, a cristalização intracelular não toma lugar antes que uma certa temperatura seja atingida. Sendo o raio crítico menor do que o raio dos poros na parede celular, a cristalização pode, então, ‘penetrar’ no citoplasma da célula. Mazur (1963) reporta que a cristalização intracelular toma lugar a uma temperatura de  $-5^{\circ}$  a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Como as células contêm uma maior concentração de íons não difusíveis (ex., proteínas) do que o fluido circundante, existe uma concentração desigual

nos lados opostos da membrana celular. A concentração total de partículas iônicas, por unidade de massa, é maior dentro do que fora da célula. Com base nisto, um ponto de congelamento pode ser esperado mais baixo para o conteúdo celular do que para o fluido circundante. A membrana celular atua, de fato, como um diafragma, ao liberar a passagem de moléculas d'água, o que se traduz em uma cristalização numa direção preferencial.

A cristalização uniforme, em tecidos, 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.

O congelamento assistido por mudanças na pressão geralmente envolve o resfriamento da amostra (não congelada) sob pressão (usualmente acima de 200 MPa) a  $-21^{\circ}\text{C}$  ou acima (sem congelamento) e, em seguida, a pressão é liberada. Altas pressões reduzem o ponto de fusão da água a um mínimo, a cerca de  $-21^{\circ}\text{C}$  a 210 MPa, o ponto tríplice para água líquida-gelo I-gelo III. Assim, o espécime estando acima deste ponto, a água permanece não congelada (Martino et al., 1998). A principal vantagem do congelamento assistido por alta pressão é que a nucleação do gelo ocorre instantânea e uniformemente ao longo da totalidade do volume da amostra por causa do grande sub-resfriamento atingido quando a expansão toma lugar. Martino et al. (1998) obtiveram pequenos cristais, localizados dentro e fora das células, com um diâmetro equivalente máximo de cerca de 7  $\mu\text{m}$ . O diâmetro médio de cristais de gelo obtidos sob pressão de 100, 150 e 200 MPa foi de 46, 35 e 22  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Chevalier, Le Bail e Ghoul, 2000b). Os tempos requeridos por este método são mais longos do que aqueles à pressão atmosférica com a mesma condição térmica porque o gradiente térmico é menor como resultado da redução do ponto de fusão da água quando a pressão aumenta (Sanz et al., 1997).

Se um músculo sub-resfriado é semeado com um cristal de gelo, forma gelo instantaneamente, mas somente no exterior da célula. Para induzir a formação na célula é necessário introduzir uma micropipeta com um cristal de gelo na ponta dentro da célula. Contudo, neste caso, o cristal de gelo cresce somente em uma direção, formando uma única espinha (Chambers e Hale, 1932). Estas espinhas vão de uma fibra muscular à outra, sempre produzindo braços laterais. As espinhas, contudo, tornam-se mais finas com o tempo, indicando que moléculas d'água estão disponíveis, difundindo-se para diferentes regiões na mesma célula (Ling, 1968). Em solução de actomiosina, os cristais de gelo apresentaram estrutura hexagonal com braços distorcido (Rapatz e Luyet, 1959). Os cantos de um cristal de gelo crescem mais rapidamente do que as faces, levando assim à formação de estrelas ou rosetas hexagonais (Luyet, 1960).

Em soluções congeladas de gelatina o gelo cúbico e vítreo prevalecem com o aumento da velocidade de congelamento ou o aumento de concentração da gelatina. 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. Géis de gelatina foram congelados com fluxo térmico unidirecional e um corte paralelo a este fluxo mostrou a morfologia celular dos cristais de gelo, caracterizada por agulhas paralelas ao fluxo térmico, separadas umas das outras por matéria seca concentrada (Figura 20). O tamanho do cristal de gelo  $d_p$  correspondeu à largura ou menor diâmetro da seção ovóide. Este valor pode ser definido de fato como um grau de segregação do gelo em uma zona interdendrítica. A adição de sal ao gel levou a um considerável aumento no tamanho do cristal (Woinet et al., 1998).

Lâminas tomadas em géis de gelatina perpendicularmente ao fluxo térmico mostraram o arranjo dos cristais de gelo crescendo na matriz de matéria seca, paralelamente ao fluxo da superfície externa em direção ao centro da

amostra. A parede entre os cristais de gelo formou-se finamente devido à baixa concentração de matéria seca do gel (Chevalier, Le Bail e Ghoul, 2000a).

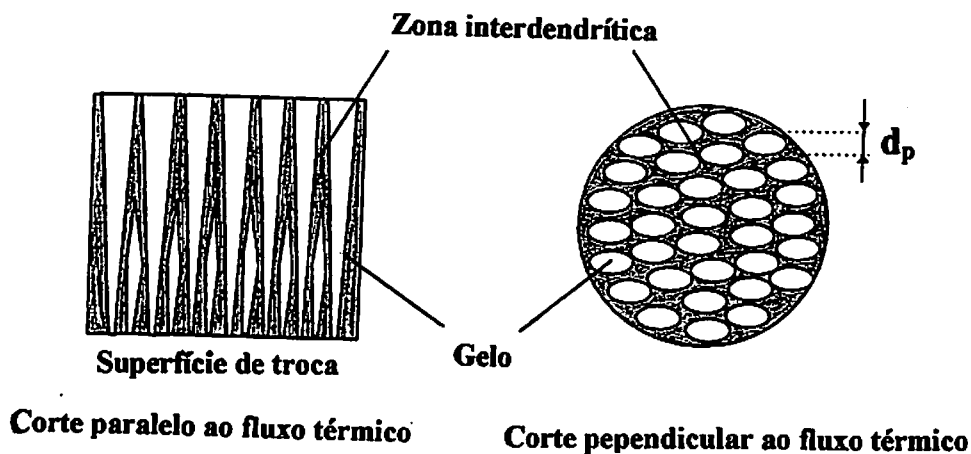


FIGURA 20 Esquema estrutural de um gel de gelatina congelado com fluxo térmico unidirecional (Woinet et al., 1998).

Temperaturas crioscópicas dependem da concentração dos solutos, peso molecular e grau de dissociação, e, ainda, das características do solvente (Fennema e Powrie, 1964; Smith, 1962). Frutos com maior conteúdo de açúcar e ácido têm uma temperatura crioscópica mais baixa, na faixa de  $-1^{\circ}$  a  $-2,5^{\circ}\text{C}$ . Para algumas variedades de maçã e pêra, esta pode atingir  $-3^{\circ}\text{C}$  (Guegov, 1979a,b). Para pêssegos,  $-3,2^{\circ}\text{C}$ ; para algumas cerejas,  $-3,5^{\circ}\text{C}$ ; para bananas,  $-3,6^{\circ}\text{C}$  e para uvas de  $-5^{\circ}$  a  $-6^{\circ}\text{C}$ .

Guegov (1978) mostrou que as temperaturas crioscópicas de frutos frescos e estocados no frio (três meses) com o mesmo conteúdo de sólidos solúveis são diferentes. Em maçãs e pêras, o ponto de congelamento é mais alto

nos frutos estocados do que nos frutos frescos com o mesmo conteúdo de sólidos. Este fenômeno é provavelmente devido a mudanças na permeabilidade das membranas celulares e mudanças nos complexos de pectina e hemicelulose que facilitam a formação inicial do gelo. Em uvas, que não amadurecem durante a estocagem no frio, o ponto de congelamento dos frutos estocados é mais baixa do que nas uvas frescas com o mesmo conteúdo de sólidos solúveis. As membranas celulares das uvas sofrem, comparativamente, menores mudanças bioquímicas durante a estocagem fria. Mas, como resultado de uma intensiva liberação de umidade, que é sete a nove vezes maior do que em maçãs e cinco a seis vezes maior do que em pêras, condições são criadas para uma certa solidificação do esqueleto da membrana. Supõe-se que a cristalização inicial é então prevenida, a medida que a temperatura crioscópica é reduzida.

O quadro da formação de gelo em frutas é complicado pela influência de vários fatores: sua complexa composição química, sua estrutura, a presença de inibidores de cristalização, o aparecimento de fases metaestáveis, a formação de complexas misturas eutéticas, a solidificação de parte do material como vítreo e, finalmente, a presença de uma certa quantidade de água não congelável. Em nenhuma fruta, a quantidade de água congelada excede 90% a  $-25^{\circ}\text{C}$ . A variedade e estado fisiológico dos frutos, a viscosidade do protoplasma, a estrutura histológica de tecidos, as dimensões das células e a permeabilidade de suas membranas atuam algumas vezes como fortes obstáculos à cristalização, assim como as dimensões e forma geométricas, a temperatura de refrigeração do meio e o coeficiente de transferência de calor.

### 2.3.3.2 Vitriificação

O termo vitriificação pode ser usado para descrever o processo no qual a água líquida de baixa viscosidade é transformada em um líquido de alta viscosidade, que é referido como vítreo. Na água vitrificada há movimentos mo-

leculares desprezíveis. As moléculas podem oscilar em torno de uma posição fixa, mas não podem mover-se de posição (Franks, 1985).

Durante o congelamento de soluções contendo inibidores de cristalização, os cristais de gelo e a solução líquida sub-resfriada são formados, a última solidificando em uma massa vítrea à medida em que a temperatura decresce (Flink, 1975; Mackenzie, 1975b e Simatos, 1976).

Quando a temperatura é reduzida, o volume livre decresce, tornando a mobilidade molecular, translacional e rotacional, mais difícil. Aumentos em volumes livres (normalmente indesejáveis) podem ser obtidos pela adição de um solvente com peso molecular mais baixo, assim como a água, ou aumentando a temperatura, com ambas ações aumentando o movimento translacional das moléculas.

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) é a temperatura na qual uma solução supersaturada converte a vítrea. Valores de  $T_g$  são observados em substâncias que contêm consideráveis regiões que são amorfas ou parcialmente amorfas (tecidos e muitos outros alimentos), sem importar se estes contêm gelo.

Em sistemas biológicos, os solutos raramente cristalizam durante resfriamento ou secagem e, assim, regiões amorfas e transição vítrea são comuns. Muitos alimentos são estocados a  $T > T_g$ , resultando em uma mobilidade molecular muito maior e uma estabilidade muito menor do que a atingível se  $T < T_g$  (Levine e Slade, 1988; Slade e Levine, 1991; Fennema, 1996).

As temperaturas de transição vítrea de muitos componentes alimentares solúveis em água (a maioria carboidratos e proteínas) são elevadas e aumentam com o aumento do peso molecular. A transformação vítrea é uma típica fase de transição observada em sistemas contendo carboidratos, glicerol e outros meios protetores (Mackenzie, 1975b; Simatos, 1976). A consequência mais importante da transição vítrea é um aumento da mobilidade molecular e do volume livre



acima da  $T_g$ , que pode resultar em mudanças deteriorativas físicas e físico-químicas (Roos e Karel, 1991; Slade e Levine, 1991; Roos, 1995).

Segundo a teoria da nucleação homogênea, sob temperaturas abaixo de um certo ponto (para água,  $-150^\circ\text{C}$ ), a formação de estrutura cristalina é impossível –as moléculas não têm mobilidade suficiente para formarem uma rede cristalina (Simatos et al., 1975a). Consequentemente, se um produto congelado a  $-150^\circ\text{C}$  ainda contém frações de água, em um futuro decréscimo da temperatura esta fração d'água somente poderá mudar para o estado vítreo. Isto pode acontecer teoricamente na faixa de  $0^\circ$  a  $-150^\circ\text{C}$  durante o resfriamento ultra rápido (Simatos et al., 1975a; Smith, 1954).

A  $T_g$  para a água pura é cerca de  $-135^\circ\text{C}$  (que é o final da curva no diagrama de estado), mas a presença de solutos dissolvidos aumenta esta temperatura. É difícil dar um valor preciso para a  $T_g$  da água. Johari, Halbrucker e Mayer (1987) mostraram que a água vítrea e a líquida seguem um caminho reversível através de uma faixa de temperatura de  $-160^\circ$  a  $-125^\circ\text{C}$ , na qual o estado estrutural permanece termodinamicamente contínuo.

Rasmussen e Luyet (1969) assumem que, sob temperaturas abaixo da temperatura de transição vítrea, uma solução pode ser representada como um sistema de cristais de gelo circundados por uma 'matriz' amorfa. A uma temperatura acima da  $T_g$ , esta matriz muda para um 'líquido' sub-resfriado com viscosidade muito elevada. Esta temperatura marca uma mudança nas propriedades físicas da água que ainda retêm o arranjo ao acaso das moléculas.

A curva correspondente a  $T_g$  vai desde a  $T_g$  da água pura até a do soluto seco. O volume da massa amorfa solidificada e a intensidade do processo de transformação vítrea e devitrificação dependem da concentração e natureza das substâncias dissolvidas e da velocidade de resfriamento (Simatos et al., 1975b).

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. A  $T_g$  aumenta com a concentração. Na zona vítrea, tem-se a estabilidade do sistema, porque a viscosidade é muito alta, em torno de  $10^{11}$  a  $10^{14}$  Pas, decrescendo drasticamente acima da  $T_g$  (Figura 21).

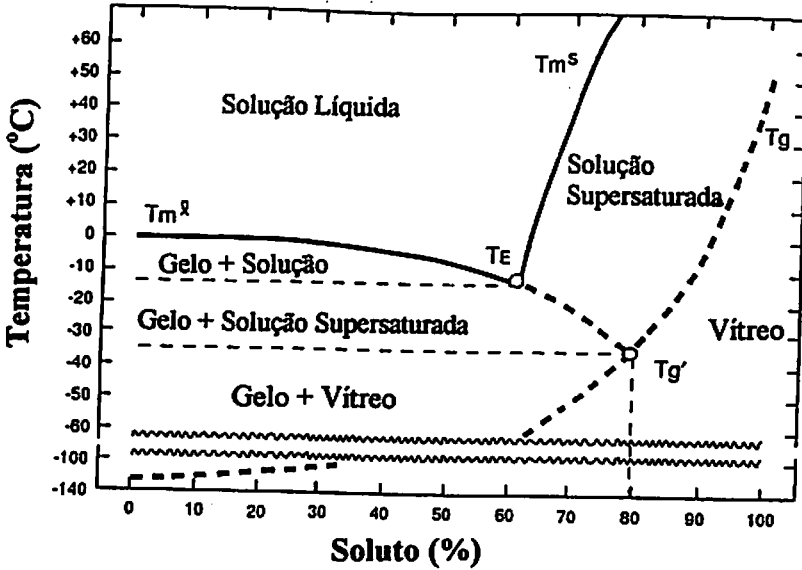


FIGURA 21 Diagrama de estado de um sistema binário. As linhas pontilhadas representam condições de equilíbrio metaestável. As demais linhas, condições de equilíbrio (Fennema, 1996).

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) envolve a transição de uma massa vítrea a um estado 'rubbery' tipo líquido (Figura 22). Estado rubbery é um termo usado para descrever a natureza viscoelástica de grandes polímeros na faixa de temperatura  $T_m$  a  $T_g$ , isto é, quando a substância ou parte dela está entre os estados vítreo e líquido. O estado vítreo se encontra a temperaturas abaixo da  $T_g$  ( $T < T_g$ ) e o estado rubbery se encontra acima da  $T_g$ , mas abaixo da tempe-

ratura de fusão ( $T'_g < T < T_m$ ). O estado amorfo menos estável (mais dinâmico) para um ingrediente é o estado rubbery. Neste estado, a estabilidade e outros problemas de qualidade podem ocorrer. O estado amorfo mais estável é o vítreo (Best, 1992).

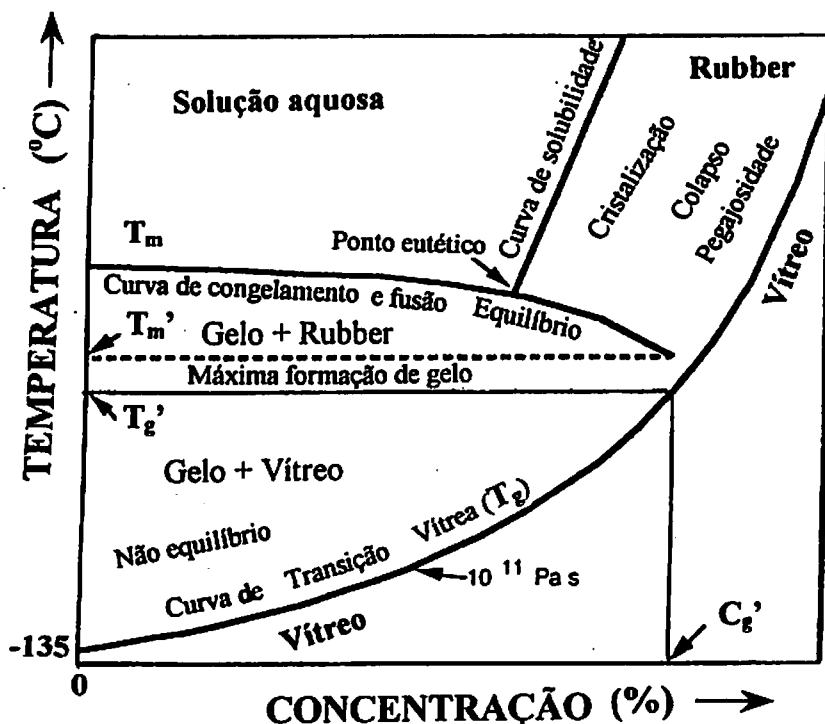


FIGURA 22 Diagrama de estado mostrando a estabilidade no estado vítreo e as mudanças dependentes do tempo no estado 'rubbery'. A máxima formação do gelo ocorre na região acima da  $T'_g$  mas abaixo da temperatura de fusão do gelo com a matriz não congelada maximamente concentrada por congelamento. A concentração da matriz não congelada ( $C'_g$ ) é igual a da solução com  $T'_g = T'_g$  (Roos e Karel, 1991).

Maltini (1977) determinou que soluções concentradas de sacarose (60% a 66%) não cristalizavam durante o resfriamento se nenhum núcleo de cristalização estivesse presente. Com um aquecimento, a água existente cristalizava com um considerável efeito exotérmico, equivalente ao da subsequente fusão. Este fenômeno era irreversível e ocorria, dependendo da concentração da solução, na faixa de  $-80^{\circ}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Isto foi definido pelo autor como devitrificação, embora não fosse precedido por transição vítrea. Um similar fenômeno irreversível foi observado por Simatos et al. (1975b) no plasma sanguíneo.

Tem sido estabelecido, por difração de raio-x e microscopia eletrônica, que tecidos 'vitrificados' contêm cristais ultra pequenos, dispersos em um meio amorfo (Luyet, 1957; Meryman, 1960).

O conceito de Transição Vítrea x Mobilidade Molecular é muito utilizado para prever: a estabilidade de alimentos congelados, ótimas condições para liofilização de alimentos e mudanças físicas tais, como gelatinização e cristalização. Normalmente, a temperatura segura para a estocagem de alimentos congelados é de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Contudo, pesquisadores têm mostrado que a  $T_g$  varia amplamente entre diferentes alimentos (Tabela 1). Por exemplo, a  $T_g$  para milho doce é de  $-15^{\circ}\text{C}$ , enquanto que para feijões verdes é de  $-27^{\circ}\text{C}$ . A  $T_g$  para alimentos cuja estrutura pode ser severamente danificada pelo congelamento é consideravelmente menor ( $-33^{\circ}\text{C}$ ), inferior para morangos e  $-41^{\circ}\text{C}$  para tomates (Taylor, 1995). É importante a determinação desta temperatura, já que representa o limite máximo no qual o produto mantém, para uma grande extensão química, a estabilidade (Guegov, 1981). A mobilidade molecular e a viscosidade governam transformações estruturais dependentes do tempo, por exemplo, pegajosidade, colapso e crocância.

TABELA 1 Alguns valores de Transição Vitrea  $T_g'$  em alimentos

Alimentos	$T_g'$ (°C)
Suco de frutas	-37 a -43
Frutas frescas	-32 a -41
Vegetais frescos	-8 a -15
Vegetais congelados	-12 a -27
Queijos	-13 a -33
Peixes	-6 a -12
Músculo bovino	≈ -12

Levine e Slade (1989, 1990)

Lim e Reid (1991) reportaram o aumento da estabilidade em soluções de maltodextrina concentradas por congelamento abaixo da  $T_g'$ . Acima da  $T_g'$  a viscosidade decresce rapidamente por causa da fusão do gelo que pode aumentar a velocidade de difusão. Contudo, a fusão do gelo também leva à diluição da matriz não congelada e, eventualmente, a uma reduzida concentração de reagentes potenciais.

A velocidade de resfriamento requerida para atingir o estado vítreo, a então chamada velocidade crítica de resfriamento, não é somente importante no design da vitrificação de soluções e protocolos, mas também prevê a habilidade de formação do estado vítreo na solução. A concentração do soluto requerida para vitrificação é chamada de concentração crítica  $C_v$ . Na crioproteção é necessário reduzir a concentração crítica requerida pelas substâncias utilizadas para reduzir sua toxicidade (Sutton, 1992).

Guegov (1978) estabeleceu que fenômenos de transformação vítrea e devitrificação em alguns frutos (pêssegos, pêras, limões, uvas), mas muito raramente em vegetais, ocorrem na região de temperaturas superbaixas. Estes fenômenos provavelmente refletem o comportamento de pequenas frações de água ligada, possuindo um elevado grau de energia de ligação. Para a criopreservação, são necessárias temperaturas bem abaixo da  $T_g$  durante o armazenamento para minimizar os efeitos de relaxamento na estrutura do material e evitar a perda de viabilidade e danos mecânicos pela formação de cristais de gelo durante o reaquecimento (Roos, 1995).

#### 2.4 A morfologia do gelo 8

A água pode existir em um grande número de formas sólidas, dependendo da pressão e temperatura que prevalecem no momento da transição. Nove diferentes formas de gelo são conhecidas, cada uma definida pela sua estrutura cristalina. Estas estruturas polimórficas são designadas por numerais romanos de I a IX.

O gelo comum, gelo I, é cristalino, funde a  $0^\circ\text{C}$  a pressão atmosférica e é a única variedade de gelo que é mais leve do que a água sob as mesmas condições de temperatura e pressão. Há indicações de que o gelo I pode existir como gelo  $\alpha$ , que é hexagonal e aparece quando a água solidifica próximo a  $0^\circ\text{C}$ , e o gelo  $\beta$ , que é romboedral e aparece quando a água é sub-resfriada a temperaturas inferiores. As estruturas de II a VIII permanecem estáveis somente a pressões elevadas (acima de 10.000 atm), condição não encontrada em alimentos. Contudo, Rey (1959) não exclui a possibilidade de que certas formas de gelo, resistentes a altas pressões, desenvolvam-se em tecidos durante o resfriamento muito rápido. O gelo II é caracterizado por um lado centralizado ortorrômbico contendo oito moléculas. O gelo III é um corpo centralizado ortorrômbico contendo 16 moléculas e tendo  $a:b:c = 1,73:1:1,22$  (Matz, 1965). O gelo IV, conhe-

cido somente por água pesada, é metaestável. O gelo VII tem uma densidade de aproximadamente  $1,7 \text{ g/cm}^3$  e requer pressões de até 21.700 atmosferas para ser estável (Encyclopaedia Britannica, 1976).

O gelo I é o único tendo uma densidade menor do que a água líquida, resultando em um aumento de volume de ~9% no congelamento a  $0^\circ\text{C}$  e aumentando ~13% a  $-20^\circ\text{C}$ . A formação de outros gelos polimórficos geralmente envolve um decréscimo do volume (aumento em densidade) relativo ao estado líquido.

Algumas vezes é possível obter certas formas de gelo, tais como o gelo III ou VI, fora de suas regiões de estabilidade, especialmente com a ajuda de agentes nucleantes específicos para cada forma (Kalichevsky, Knorr e Lillford (1995).

Mudanças em temperatura e pressão transformam uma classe de gelo em outra. As mudanças são específicas e têm sido mapeadas no diagrama de fases. Com a liberação da pressão, o gelo III (cristais menores, mais densos do que a água líquida) muda para gelo I (Chevalier, Le Bail e Ghoul, 2000b). Pouco é conhecido sobre o polimorfismo do gelo a alta pressão, porque não existe na natureza. As três formas de gelo que existem sob pressão normal parecem idênticas quando examinadas ao microscópio, mas podem ser distinguidas pelas diferenças em seus elétrons ou padrões de difração de raio-x.

As estruturas de vários gelos polimórficos estão bem estabelecidas e o principal aspecto é que a pressão não destrói a natureza de quatro ligações de hidrogênio. A altas pressões, cada átomo de oxigênio está ligado a quatro átomos de hidrogênio, embora o verdadeiro ângulo tetraédrico característico do gelo I seja progressivamente distorcido até que o efetivo número de coordenação (incluindo hidrogênios ligados e não ligados) aumentando até um valor limite de oito átomos.

Somente poucas regiões têm sido profundamente examinadas para possíveis aplicações de baixas temperaturas e elevadas pressões em processamento e preservação de alimentos (Franks, 1975). Na Figura 23, o modelo P-V-T (diagrama de equilíbrio para pressão, volume e temperatura do gelo) promove uma explanação da não usual relação do volume molar da água em termos qualitativos e quantitativos. O arranjo tetraédrico das moléculas d'água na grade cristalina é muito aberto. Por exemplo, para esferas arranjadas tetraedricamente o volume vazio entre as esferas soma 66% do volume total ocupado pela estrutura. Isto pode ser comparado com o volume vazio de 39,5% para o número de coordenação  $z=8$ . Quando a estrutura de pontes de hidrogênio quebra, a distância intermolecular aumenta ligeiramente porque o raio médio de van der Waals das moléculas d'água é maior do que a distância O-O na ponte de hidrogênio. Contudo, isto é compensado pelo aumento no número de coordenação; que resulta em um decréscimo do volume vazio e, assim, em um decréscimo do volume molar como um todo. A formação e quebra dos aglomerados ocorre por troca de energia por meio de colisões na fronteira do agrupamento (Némethy e Scheraga, 1962a,b).

Por simulação computacional da dinâmica molecular da água, duas estruturas estáveis foram encontradas. As duas são similares e foram chamadas de gelo B e gelo XII. O gelo XII é, similarmente ao gelo IV, metaestável na região de estabilidade do gelo V e próton-desordenado, de modo que somente as posições dos átomos de oxigênio são conhecidas com alto grau de certeza (Borzák e Cummings, 1999).



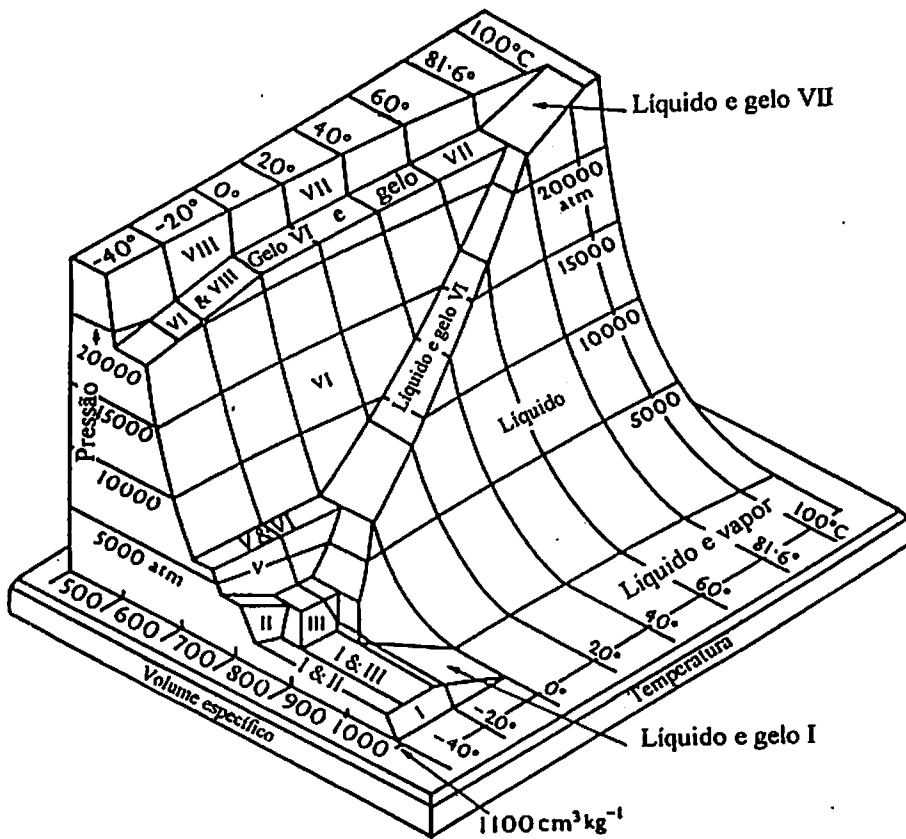


FIGURA 23 Diagrama de equilíbrio mostrando a dependência entre pressão, volume e temperatura (P-V-T) (Franks, 1975).

A estrutura do gelo, à pressão normal ou reduzida, pode tomar três formas básicas: hexagonal, cúbico e vítreo ou amorfo. Finas camadas d'água pura ou de soluções aquosas podem ser congeladas a essas três formas de gelo, dependendo da espessura da camada e do método de congelamento empregado (Roos e Morgan, 1990).

O gelo, quando visto em três dimensões, envolve dois planos de moléculas. Estes são paralelos, muito juntos e movem-se como uma unidade (Figura 24). Pares de planos deste tipo formam o plano basal do gelo (eixo a). Por ‘empilhamento’ de vários planos basais, uma extensa estrutura de gelo é obtida, crescendo na direção c.

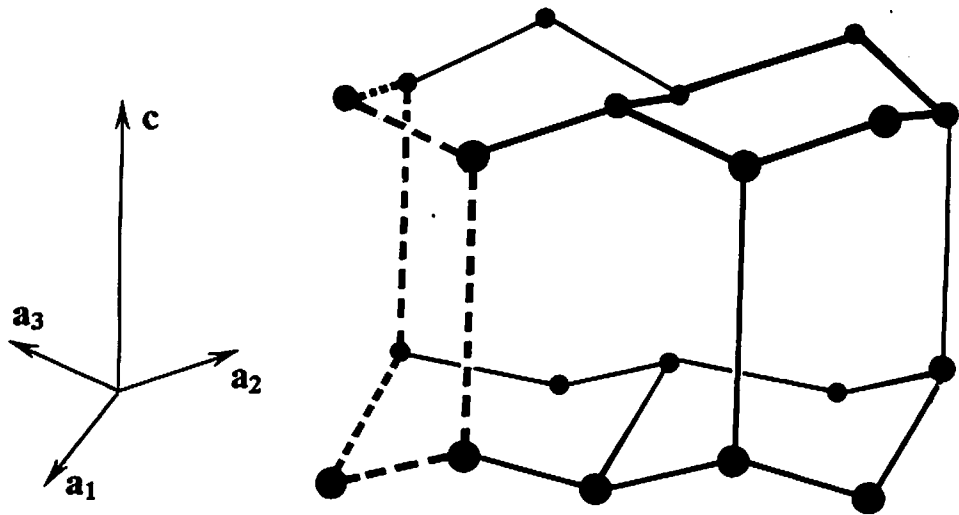


FIGURA 24 Estrutura do gelo comum. Combinação de duas camadas de elevações diferentes. As linhas sólidas mostram a configuração em ‘cadeira’ e as linhas pontilhadas a configuração em ‘barco’ (Hobbs, 1974, citado por Echlin, 1992).

O gelo é monorrefringente na direção c, contudo, é birrefringente em todas as outras direções. Um cristal é birrefringente quando o eixo óptico, que coincide com o eixo cristalográfico c, é perpendicular à direção de propagação do plano da luz polarizada (Fennema, 1996).

A representação do gelo tem certas anomalias que explicam alguns dos comportamentos deste. Ocasionalmente, três prótons juntam-se em torno do oxi-

gênio, formando um íon  $(\text{OH}_3)^+$ . Similarmente, íons  $(\text{OH})^-$  podem ser formados (Figura 25).

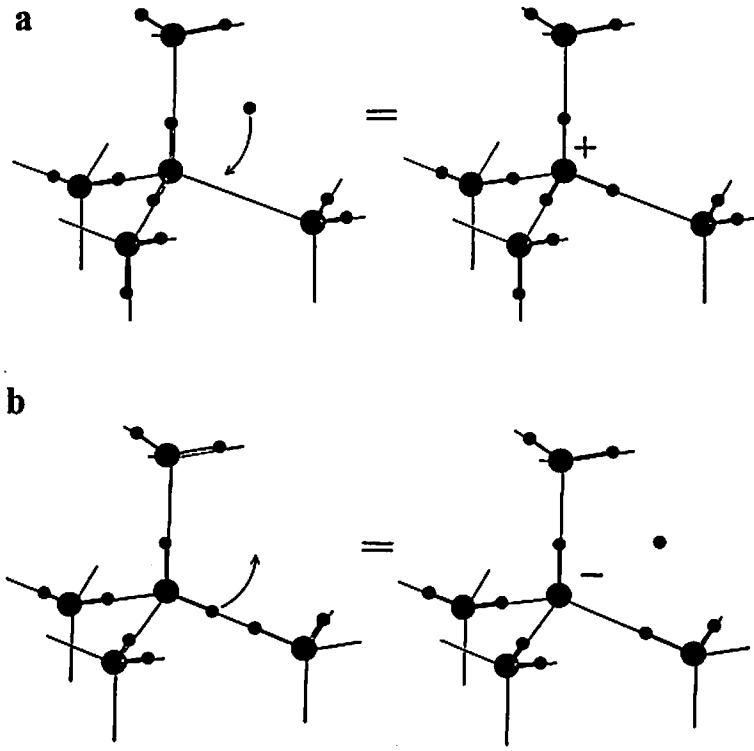
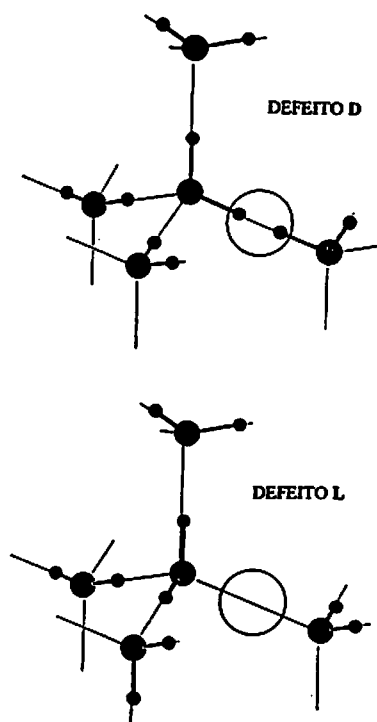


FIGURA 25 Defeitos iônicos presentes no cristal de gelo. a) Íon positivo chamado hidrônio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) e b) íon negativo chamado hidroxil ( $\text{OH}^-$ ). (Runnels, 1966).

Outro tipo de defeito é a dupla ocupação dos espaços O-O com prótons (D-defeitos; do alemão “doppelt”, dobrado, significa uma duplicação da ligação) ou espaços vazios (L-defeitos; de “leer”, vazio, indicando a ausência de um próton) (Figura 26). As imperfeições nos cristais de gelo podem acontecer pela

habilidade de moléculas em mudarem suas orientações. 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 das moléculas d'água na grade cristalina. Se estes ocorrem na superfície do cristal, permitem contínuas etapas de crescimento (Runnels, 1966; Quervain, 1975).



**FIGURA 26** Imperfeições na grade cristalina do gelo por rotação das moléculas. No defeito D, o hidrogênio carregado positivamente arma-se de dois pontos de moléculas adjacentes, uma em direção à outra. No defeito L isto acontece com os dois 'braços' eletrônicos carregados negativamente (Runnels, 1966).

Além da mobilidade envolvida nos defeitos do cristal, há outros tipos de atividades no gelo. Cada molécula HOH no gelo gira com uma certa amplitude (assumindo cada molécula vibrar como uma unidade) de cerca de  $4 \cdot 10^{-5}$   $\mu\text{m}$  a  $-10^\circ\text{C}$ . Além disso, as molécula HOH que presumivelmente existem em alguns dos espaços intersticiais no gelo podem aparentemente difundir lentamente através da rede cristalina (Fennema, 1996). O gelo pode ser considerado um semicondutor, embora seus transportadores de corrente sejam prótons (nos semicondutores mais conhecidos os transportadores são elétrons). Este pode ser descrito como um semicondutor 'protônico' (Runnels, 1966).

#### 2.4.1 Gelo hexagonal ( $I_h$ )

O cristal hexagonal, à pressão normal, é característico do polimorfismo estável do gelo. A extensiva ligação de hidrogênio, que mantém a estrutura do gelo, é muito lábil e mudanças na pressão durante o processo de resfriamento ou mudanças na temperatura do material solidificado, podem prontamente afetar a estrutura do cristal. Os cristais hexagonais individuais podem ser muito grandes, com muitos braços e apresentar defeitos como limites granulares, amontoamento, contornos curvos e deslocamentos, estendendo-se por longas distâncias na amostra (Roos e Morgan, 1990).

O grande número de pontes de hidrogênio no gelo é o meio pelo qual o material pode absorver uma grande quantidade de energia livre para a reorganização de prótons. O modelo estrutural, por difração de raio-x, do  $I_h$ , mostra que o material é um amontoado de folhas enrugadas (Figura 29a) umas sobre as outras. Imperfeições, deslocamentos e estranhas inclusões no gelo podem contribuir para a extensão da deformação, que também é dependente da temperatura. A temperatura maiores, se a tensão excede algum valor crítico, o gelo poderá sofrer fratura ou exibir deformação plástica, devido ao movimento de deslocamento neste. Com decréscimo da temperatura há menos deformação plástica e, a

$-100^{\circ}\text{C}$  o gelo torna-se um material muito quebradiço. A estrutura do cristal  $I_h$  é estabilizada a baixas temperaturas. Este também pode ser formado sob circunstâncias especiais quando o gelo cúbico  $I_c$  é aquecido a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O sistema hexagonal inclui todos os cristais que podem ser referidos como tendo quatro eixos, três destes sendo iguais e alinhados em um plano horizontal (basal), interceptando uns aos outros com um ângulo de  $60^{\circ}$  (Figura 27). Estes são chamados eixos laterais e são designados pela letra  $a$ . O quarto eixo ou eixo principal é perpendicular ao plano dos eixos laterais e é chamado de eixo  $c$  (plano prismático). Este pode ser mais longo ou mais curto do que os eixos laterais. Três eixos iguais dividem os ângulos entre os eixos laterais e são chamados de eixos intermediários, sendo designados pela letra  $b$  (Kraus, Hunt e Ramsdell, 1959).

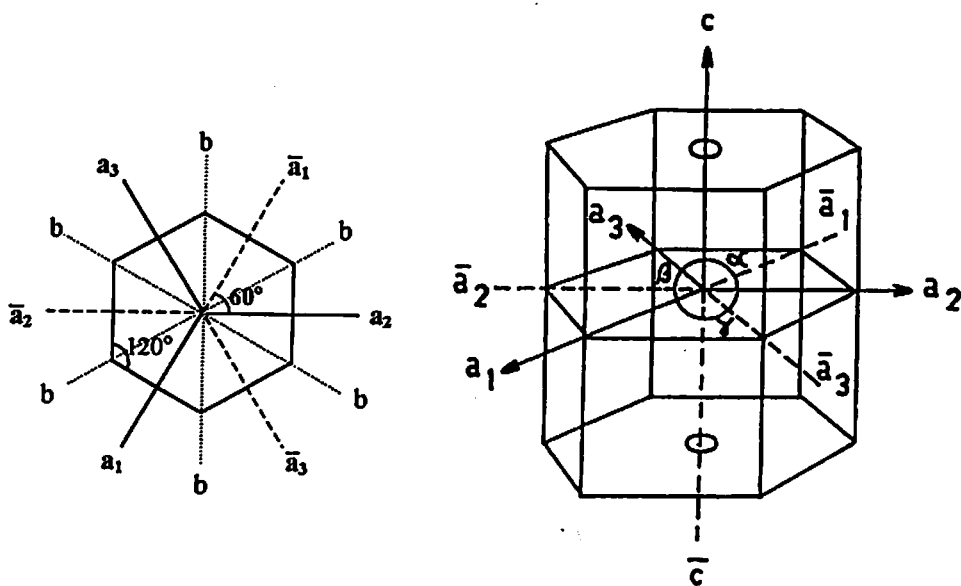


FIGURA 27 Eixos cristalográficos, ou de simetria, do sistema hexagonal (Zaritzky, 1997).

## 2.4.2 Gelo cúbico ( $I_c$ )

Tem sido sugerido por Echlin (1992) que a água na atmosfera superior pode, algumas vezes, congelar primeiro como gelo cúbico ( $I_c$ ) e formar o halo de Scheiner. Esse fenômeno ocorre a  $-28^\circ\text{C}$  e é ocasionalmente visto a um baixo ângulo de visão ao redor do sol ou da lua. Este é um dos poucos exemplos do gelo cúbico ocorrendo na natureza.

O gelo cúbico, em padrão de raio-x, apresenta-se como um mosaico polvilhado de pequenos cristais (Figura 29b), com dimensões médias de  $0,1\ \mu\text{m}$ , que não pode ser detectado por difração eletrônica quando  $<30\ \text{nm}$  (Roos e Morgan, 1990).

O gelo cúbico é uma forma metaestável do gelo I que existe entre  $-80^\circ$  e  $-150^\circ\text{C}$  e pode ser formado em laboratório, sob as seguintes condições:

1. quando o vapor d'água condensa sobre um substrato mantido abaixo de  $-130^\circ\text{C}$ ;
2. quando o gelo amorfo ( $I_A$ ) é aquecido acima de  $-150^\circ\text{C}$ ;
3. quando as formas de gelo a alta pressão são resfriadas, a temperatura de nitrogênio líquido (NL), a pressão atmosférica reduzida e a amostra é então aquecida a  $-116^\circ\text{C}$  por poucos minutos.

O gelo cúbico não pode ser formado por simples resfriamento do gelo hexagonal abaixo de  $-80^\circ\text{C}$ , embora duas especiais exceções tenham sido vistas em trabalhos de Mayer e Hallbrucker (1987). Estes autores produziram  $I_c$  pulverizando diretamente gotas d'água de  $3\ \mu\text{m}$  a alta velocidade em uma placa de cobre mantida a  $-83^\circ\text{C}$ . Sob aquecimento, o gelo cúbico torna-se irreversivelmente gelo I, com uma leve mudança de entropia.

Do ponto de vista estrutural, as posições dos átomos de oxigênio no gelo cúbico são muito mais próximas do que as encontradas no gelo hexagonal (Figura 28). O gelo cúbico contém oito moléculas d'água a mais (Echlin, 1992).

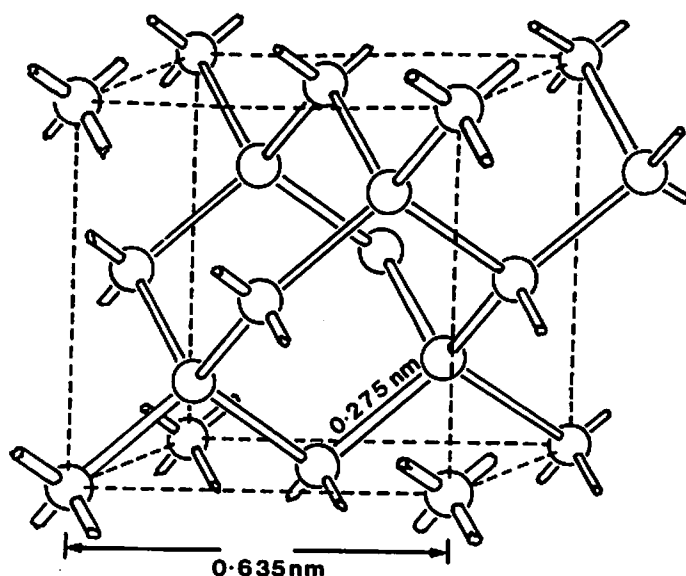


FIGURA 28 Estrutura do gelo cúbico ( $I_c$ ) mostrada pela posição dos átomos de oxigênio (Fletcher, 1970).

### 2.4.3 Gelo vítreo ( $I_v$ )

O gelo amorfo ( $I_A$ ) ou vítreo ( $I_v$ ) é uma forma não cristalina do gelo, que, do ponto de vista de um criomicroscopista, é o estado ideal da água. Apresenta-se, por difração de raio-x, liso e sem traços característicos (Figura 29c), mas possuindo um número de anéis de difração difusa com raio e largura bem definidos. Diz-se que um material está em um estado vitrificado se, primeiramente, não tem forma definida e se sofre uma transição de fase a um estado cristalino quando aquecido acima da temperatura de devitrificação (Roos e Morgan, 1990).

O gelo não cristalino pode ser formado condensando-se o vapor d'água em uma superfície mantida abaixo de  $-160^\circ\text{C}$  ou resfriando-se rapidamente mí-



nimas quantidades ( $\mu\text{m}^3$ ) de água líquida. Os processos que levam à formação do  $I_A$  pelo lento depósito de vapor d'água a temperatura de NL não são bem conhecidos. As moléculas d'água aterrissam na superfície fria, rapidamente perdem sua energia livre e permanecem mais ou menos em seu ponto de contato inicial. Há insuficiente energia para migrarem sobre a superfície para as posições de mínimo potencial de energia que favorecem um cristal.

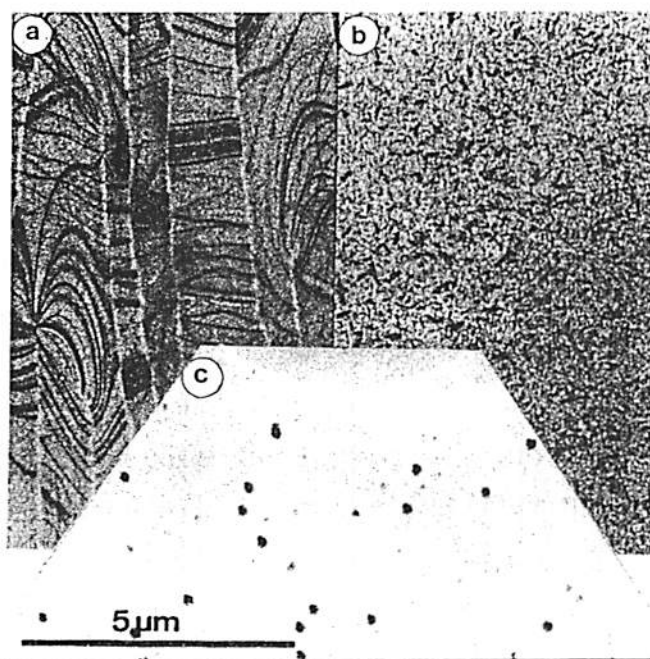


FIGURA 29 Micrografias eletrônicas de três formas de gelo de água pura. a)  $I_h$  obtido por resfriamento rápido de uma camada d'água de 50-80 nm espalhada em um filme de carbono; b)  $I_c$  obtido por aquecimento de uma camada de 70 nm de  $I_v$ . e c)  $I_v$  obtido por deposição de vapor d'água em uma superfície mantida a menos de  $-123^\circ\text{C}$  (Dubochet et al., 1982, citados por Echlin, 1992).

O gelo vítreo pode ser formado também pelo congelamento ultra rápido de um fino filme d'água situado em uma estrutura capilar (Luyet, 1960). É difícil um filme vítreo isolar-se da água; a combinação de cristalino e vítreo é mais facilmente obtida. A presença de cristais com a água vítreo a deixa extremamente instável e a cristalização toma lugar quando a temperatura chega acima de um certo ponto. De acordo com Luyet, o gelo vítreo pode passar a líquido a uma alta velocidade de aquecimento (fusão vítreo). O gradiente de temperatura é de vários graus por segundo, de forma que o produto deva ter um tamanho muito reduzido mas uma grande superfície específica.

#### **2.4.4 Demais arranjos cristalinos**

Luyet (1960) fotografou mudanças em gotas de soluções aquosas tomadas entre duas coberturas de vidro e colocadas em banho de 32° a -101°C. Ele classificou os tipos de formação de gelo assim obtidos em nove categorias baseadas na morfologia. Luyet e colaboradores, citados por Fennema (1996) e MacKenzie (1975a), estudaram a natureza dos cristais de gelo formados na presença de vários solutos, incluindo sacarose, glicerol, gelatina, albumina, miosina e polivinilpirrolidina (Figura 30). Foram observados, para estruturas maiores de gelo, formas hexagonais, dendritos irregulares, esferulitas ásperas e esferulitas lábeis.

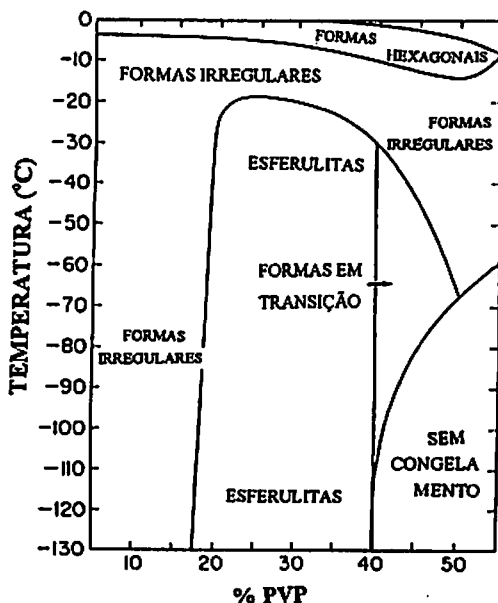


FIGURA 30 Padrões de congelamento dependentes da temperatura de resfriamento e da concentração do soluto em solução aquosa de polivinilpirrolidina (MacKenzie, 1975b).

A velocidade de crescimento do plano basal da água subresfriada é duas ou três vezes menor em magnitude do que a do plano prismático. Esta diferença na velocidade de crescimento entre os planos deve-se, principalmente, à cinética anisotrópica de interface (Nada e Furukawa, 1996). A um sub-resfriamento relativamente pequeno ( $\Delta T < 1^\circ\text{C}$ ), deu-se o crescimento de cristais com cantos nítidos e com ângulos de  $60^\circ$  ou  $120^\circ$ , entre dois lados. A velocidade de crescimento foi cerca de 30 a 50  $\mu\text{m/s}$ . No caso de um sub-resfriamento relativamente grande ( $\Delta T > 1^\circ\text{C}$ ), vários cristais cresceram rapidamente na direção de maior gradiente de temperatura. Nestes, dois lados apresentaram-se paralelos e com ângulo entre

os lados adjacentes de  $60^\circ$  ou  $120^\circ$ . Neste caso, a velocidade de crescimento foi de  $100 \mu\text{m/s}$  (Shichiri, 1998).

No crescimento de um cristal de gelo em forma de disco, os planos rugosos parecem crescer rapidamente e isotropicamente enquanto a face basal lisa cresce lentamente. Cristais facetados crescem mais rapidamente do que cristais circulares. A interface rugosa circular mostrou-se decorrente de perturbações da estabilidade morfológica (Maruyama, Kishimoto e Sawada, 1997). O gelo tornou-se fino com o decréscimo da temperatura e a espessura de uma placa hexagonal a baixas temperaturas apresentou-se menor do que a de um disco. O comportamento de crescimento de cristais de gelo em água variou sob condições diversas de congelamento: a) cristais completamente redondos ( $T_m = -6,12^\circ\text{C}$ ,  $P_m = 69,45 \text{ MPa}$ ,  $-\Delta P = 0,25 \text{ MPa}$ ); b) cristais redondos e facetados ( $T_m = -16,14^\circ\text{C}$ ,  $P_m = 164,30 \text{ MPa}$ ,  $-\Delta P = 0,65 \text{ MPa}$ ) e c) completamente facetados ( $T_m = -21,79^\circ\text{C}$ ,  $P_m = 213,85 \text{ MPa}$ ,  $-\Delta P = 0,25 \text{ MPa}$ ).

Simulações computacionais da dinâmica molecular da água por Slovák et al. (2001) promoveram uma estrutura de gelo bilamiar que não se assemelha a nenhuma estrutura conhecida do gelo polimórfico. Contudo, ainda retendo o aspecto básico do gelo comum (cada molécula ligada a quatro moléculas vizinhas). Cada camada do gelo era composta de anéis hexagonais levemente distorcidos.

Nada e Furukawa (1995), também utilizando simulação, sugeriram que cada interface gelo/água tem uma estrutura difusa e as propriedades físicas diferem entre as regiões interfaciais. Posteriormente mostraram que não somente as estruturas interfaciais, mas também a cinética de crescimento difere completamente entre as interfaces (Nada e Furukawa, 1997). Foram observadas transições estruturais de uma superfície molecularmente plana a uma superfície com moléculas livres e, finalmente, a uma superfície fundida nas faces basal e prismática de cristais de gelo (Nada e Furukawa, 2000).

## 2.5 A presença d'água nas células e tecidos

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, cêras, etc.).

A célula vegetal consiste de um citoplasma multicompartimentalizado que se comunica com o meio externo através de uma membrana e parede celular. Normalmente, há uma solução diluída no lado externo e no interior uma solução concentrada que contém metabólitos, sais orgânicos e macromoléculas, variando em concentrações, dependendo da localização (Kramer e Boyer, 1995).

Em uma planta pluricelular, as células recém-formadas são pequenas em relação ao seu tamanho final. Para adaptar-se ao seu aumento, as paredes celulares das células vegetais jovens são mais delgadas e unicamente semi-rígidas, diferentemente da parede celular das células que já deixaram de crescer (McCann e Roberts, 1994). Camadas adicionais da parede celular são frequentemente depositadas no lado interno da parede primária (Figura 31). Essas camadas, que compõem a parede secundária, podem conter lignina, suberina e outros compostos que conferem a esta uma característica especial de rigidez e impermeabilidade à água. A parede celular proporciona uma habitação propriamente dita à célula vegetal. Cada parede celular interage com suas vizinhas, unindo as células, formando uma placa íntegra. Paredes celulares relativamente rígidas variam entre 0,1  $\mu\text{m}$  a muitos micrômetros de espessura.

A lamela média é uma camada amorfa que ocorre entre as paredes primárias de células adjacentes. É uma região que está livre de microfibrilas celulósicas e é então composta principalmente de pectina. As pectinas contêm numerosos resíduos de ácido galacturônico com carga negativa. Devido à sua carga negativa, as pectinas unem-se aos cátions e, quando se adiciona cálcio a uma

[REDACTED]

solução de moléculas de pectina, formam-se pontes cruzadas entre elas, dando lugar a um gel semi-rígido. Em tecidos pouco resistentes da planta, a lamela média permanece não lignificada, enquanto que em tecidos lenhosos esta torna-se fortemente permeada com lignina (Godwin e Mercer, 1982).

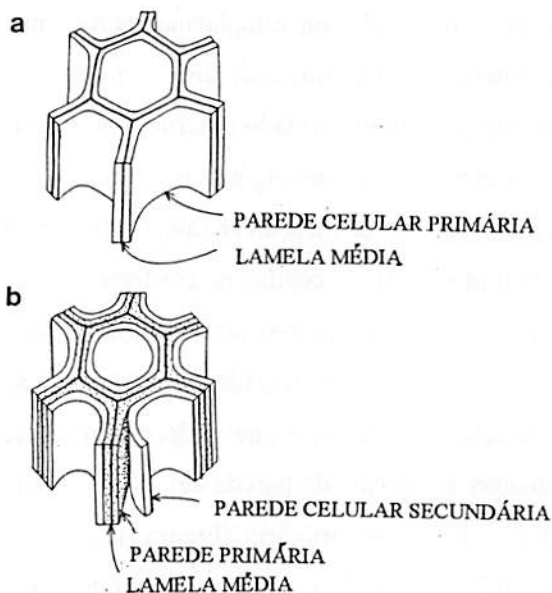
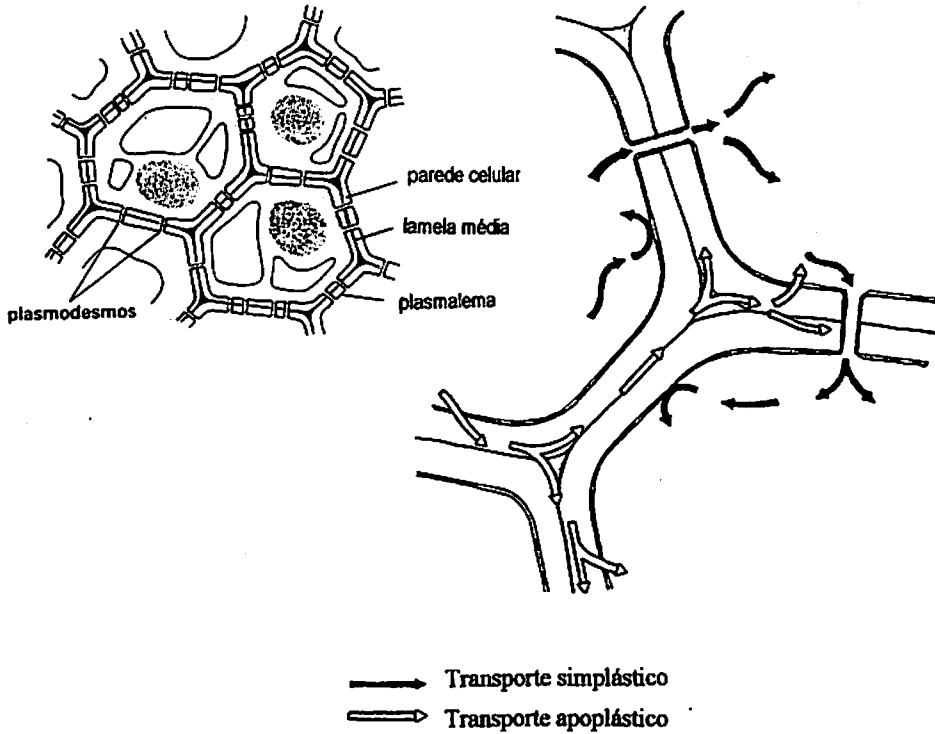


FIGURA 31 Diferença entre células vegetais (a) jovens e (b) adultas (Stryer, 1988).

Cada parede celular interage com suas vizinhas mediante finos condutos citoplasmáticos que recebem o nome de plasmodesmos (Figura 32) e atravessam as paredes celulares intercaladas unindo as células. Através dos plasmodesmos tem-se o transporte de solutos e água do protoplasma de uma célula para outra (transporte simplástico), assim como pequenas moléculas, água e íons movimen-

tam-se através dos espaços intermicrofibrilares das paredes celulares (transporte apoplástico) (Alberts et al., 1983; Mujumdar, 1995).



**FIGURA 32** Os condutos citoplasmáticos denominados plasmodesmos atravessam a parede celular e conectam as células. O plasmodesmo está revestido pela membrana plasmática comum às duas células conectadas (Alberts et al., 1983).

A água é um importante componente estrutural da parede celular. Esta forma parte da estrutura gélica das pectinas. Por causa de mudanças no conteúdo d'água na parede ocorrem mudanças do gel pectínico a uma solução viscosa. Mudanças também reduzem as pontes de hidrogênio entre as microfibrilas de

celulose e as cadeias de hemicelulose. Quando cessa o crescimento celular, o espaço ocupado pela água na parede torna-se progressivamente preenchido com lignina, assim formando a matriz e, portanto, a parede como um todo torna-se muito mais rígida (Godwin e Mercer, 1982).

Moléculas e sinais devem atravessar a parede celular. Uma vez que a matriz da parede é um gel de polissacarídeo altamente hidratado (60% em peso da parede celular primária é água), a água, os gases e as pequenas moléculas hidrossolúveis penetram rapidamente. Em comparação com a membrana plasmática, a estrutura com pontes cruzadas da parede celular só impede ligeiramente a difusão de moléculas pequenas como a água, a sacarose e o  $K^+$  (Mujumdar, 1995). Células com uma parede de 15  $\mu\text{m}$  de espessura devem à parede celular somente 10% de sua resistência ao fluxo d'água entre o citoplasma e o meio externo; os 90% restantes são devidos à membrana plasmática. As macromoléculas atravessam muito lentamente a parede celular da maioria das células vegetais (Alberts et al., 1983). Os poros da parede têm um diâmetro variável estimado entre  $4 \cdot 10^{-3}$  a  $6,5 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{m}$ . Por eles transitam água cujo diâmetro é somente cerca de  $4 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{m}$ , açúcares e aminoácidos com seus diâmetros de  $10^{-3}$  a  $1,5 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{m}$  e pequenas proteínas, mas a passagem de moléculas com peso molecular maior do que cerca de 60 daltons (diâmetro maior do que  $8,5 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{m}$ ) é geralmente bloqueada (Kramer e Boyer, 1995).

Dick (1971) concluiu que a verdadeira permeabilidade da membrana é da ordem de  $10^{-3}$  cm/s. Valores experimentais mais baixos foram explicados pela existência d'água em poros ou canais. Estes poros podem permitir um fluxo hidráulico paralelo quando há um gradiente osmótico (Rotstein e Cornish, 1978).

Um modelo do arranjo de polímeros nas paredes celulares em alongamento foi proposto por McCann e Roberts (1994), no qual as microfibrilas de celulose são orientadas transversalmente à direção de alongamento com ligações cruzadas de xiloglucanas dando maior tensão à parede. A pectina e algumas pro-



teínas fibrosas estão orientadas paralelas às microfibrilas. A pectina recém-sintetizada é fortemente esterificada e a pectina mais antiga, não esterificada, contribui para o aumento da área superficial da lamela média. Muitas proteínas globulares também estão presentes (Figura 33).

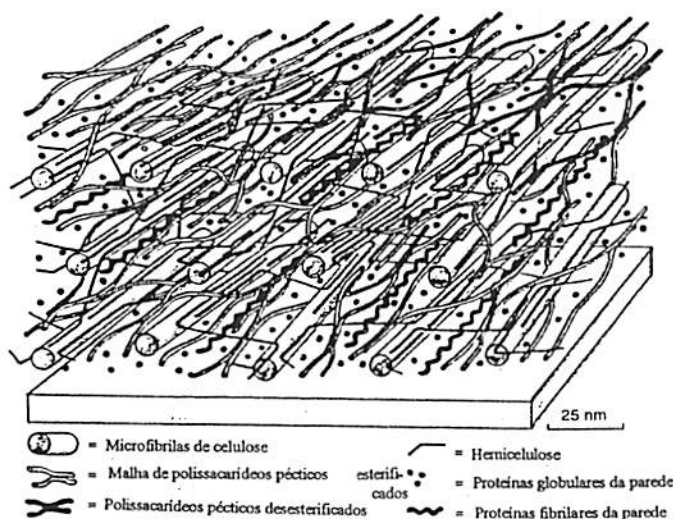


FIGURA 33 Arranjo de polímeros na parede celular baseado em medidas de visualização direta e microespectroscopia polarizada (McCann e Roberts, 1994).

As membranas são complexos de proteínas e lipídios mantidos por forças não covalentes. As interações hidrofóbicas são particularmente importantes na manutenção da estrutura. As membranas de bicamadas lipídicas têm uma permeabilidade muito baixa a íons e moléculas polares, tendo a água como uma exceção a esta generalização (Stryer, 1988). Rotstein e Cornish (1978) citam trabalhos de alguns autores como Bennet-Clark (1959) que concluiu que o proto-

plasto aumenta em permeabilidade quando plasmolisado; Tien (1974), que apontou que sob microscopia eletrônica todas as membranas examinadas eram da ordem de  $10^{-2}$   $\mu\text{m}$  em espessura e Staldemann (1963), que encontrou que a velocidade de passagem da água é controlada inteiramente pelas dimensões do tecido e não pela permeabilidade por difusão das membranas celulares.

Glinka e Reinhold (1972) observaram trocas d'água em tecidos de cenouras e encontraram que o efeito da membrana resultava em diferentes valores de permeabilidade quando esta era tratada com diferentes compostos químicos. Assim, mesmo havendo um significativo efeito limitante, este não era tão grande para mascarar a verdadeira mudança em permeabilidade obtida.

A água não está distribuída uniformemente na planta. A distribuição da água é dependente da presença e natureza hidrofílica de estruturas macromoleculares em rede, tais como as membranas, parede celular, organelas, vesículas e tubos vasculares. Nos tecidos parenquimáticos, uma grande quantidade de água (acima de 98%) reside nos vacúolos das células. O conteúdo de água da parede celular depende do arranjo das fibras de celulose e composição da matriz (Powrie e Tung, 1975). Tem sido estabelecido que na membrana celular de frutas e vegetais e sua imediata vizinhança a água está firmemente ligada. A celulose e substâncias pécticas ligadas a essas membranas são altamente hidrofílicas e estão disponíveis para ligar grande quantidade de água.

Muitos tecidos vegetais sub-resfriam até  $-40^{\circ}\text{C}$ . Nestes tecidos, grandes espaços intercelulares estão ausentes e a água extracelular pode estar em microcapilares da parede celular. Esses formam uma contínua rede entre as microfibrilas e as moléculas da matriz. Vazios equivalentes a capilares com  $4 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{m}$  de diâmetro estão presentes nas paredes celulares. Preston (1974) predisse que a água nestes capilares congela entre  $-15^{\circ}$  e  $-25^{\circ}\text{C}$ . O congelamento de soluções aquosas diluídas nestes capilares pode dar-se a temperaturas mais baixas. Estas predições são bascadas em generalizações da estrutura da parede celular. A

presença de microcapilares não somente pode deprimir o ponto de congelamento da água nos espaços intercelulares como pode impedir a propagação do gelo através do tecido. A presença de poros de pequeno diâmetro poderia facilitar o sub-resfriamento da água em grandes volumes. Se o diâmetro da microcapilaridade for suficientemente pequeno, a água na cavidade permanece sub-resfriada até ser nucleada heterogeneamente por núcleos de gelo presentes na cavidade ou homogeneamente a  $-38^{\circ}\text{C}$  (Ashworth e Abeles, 1984).

## **2.6 Distúrbios celulares provocados pelo congelamento**

Cristais de gelo crescem às custas da água em sua vizinhança imediata e a baixas velocidades de resfriamento a vizinhança celular não congelada em torno do gelo contrai quando a água é removida. Isto ocorre porque a pressão de vapor da água nas células é maior do que no gelo a mesma temperatura e a água da célula difunde através da membrana plasmática ao gelo extracelular. Os solutos tornam-se então mais concentrados, possivelmente aumentando a velocidade de reações químicas destrutivas. Alguns solutos podem cristalizar, mudando a força iônica e o pH da solução intracelular e, conseqüentemente, o estado metabólico da célula. Outras propriedades também mudam significativamente como a viscosidade, ponto de congelamento, tensão superficial e interfacial e potencial de óxido-redução.

As células morrem por exposição prolongada a soluções concentradas, as quais mudam as propriedades físicas e químicas, como ocorre no meio congelado extracelularmente. A extensão da concentração é influenciada, principalmente, pela temperatura final e, em menor grau, pela temperatura eutética do soluto presente, agitação e velocidade de resfriamento. Ocorre a concentração de solutos tóxicos no citoplasma e a desnaturação do ácido nucléico. O material membranoso pode ser perdido, talvez irreversivelmente, devido à concentração

celular durante a desidratação comprometer a integridade da membrana (Santos, 1999).

O estresse mecânico também resulta da desidratação. As células submetidas ao estresse da perda de turgor contraem e eventualmente colapsam. A alta concentração de solutos na seiva celular não congelada causa desnaturação osmótica da proteína da célula e isto afeta a textura (DeMan et al., 1979). As membranas não resistem à retração e as organelas tornam-se distorcidas quando a desidratação é severa. A parede celular desenvolve pregas e deforma a plasmalema adjacente, sendo que em algumas células com paredes celulares endurecidas pelo depósito de material rígido este dano não ocorre (Kramer e Boyer, 1995). A retração reduz a área efetiva da membrana plasmática e pode alterar a distribuição das proteínas nesta. Na desidratação de um protoplasto ocorre separação da plasmalema da parede celular (plasmólise). Ocorre também a transição de fase da membrana a uma temperatura crítica, resultando na formação de uma fase gélida dos lipídeos (Crowe e Crowe, 1986). Isto leva ao aumento da permeabilidade da membrana celular, perda da compartimentalização e do controle regulador. Estes defeitos estruturais podem potencializar a ação de fosfolipases, possivelmente mediada pela decompartmentalização do cálcio (Parkin et al., 1989). O aumento da cristalinidade é também irreversível e devido a ligações entre polissacarídeos no lugar de ligações água-polissacarídeos na celulose (Ilker e Szczesniak, 1990).

— y A tolerância ao congelamento está relacionada à composição da membrana com respeito ao grau de insaturação de lipídeos e à razão molar dos vários componentes lipídicos, tais como fosfatidilcolina, ceramida e glicosídeo estéril acilado (Shomer et al., 1998). Fosfolipídeos específicos podem ser os alvos para aumentar a injúria induzida na ordenação ou separação de fase, causando desfigurações na estrutura bilamiar (Parkin et al., 1989).

Trabalhos mostram que as membranas são os principais pontos vulneráveis no congelamento das células vivas e que os danos são causados, particularmente, pelo aumento de compostos solúveis nas porções fluidas das células durante o processo. As membranas do núcleo, mitocôndria, ribossomo, lisossomo e retículo endoplasmático podem ser danificadas pelo congelamento e descongelamento em diferentes graus. Carboidratos ajudam a proteger as membranas de danos por desidratação e manter a integridade e a função de barreira das membranas e vesículas (Bendas et al., 1996).

A destruição da membrana tem sido atribuída à segregação de vários componentes (que leva a danos irreversíveis) e/ou a transição de fase de componentes lipídicos polares. A transição de fase do líquido cristalino à fase gel leva a danos reversíveis à membrana porque a configuração bilamiar é mantida. Em contraste, danos causados pela transição do líquido cristalino à fase hexagonal é irreversível porque uma estrutura não bilamiar é formada levando à fusão da membrana, perda de compartimentalização celular e desorganização irreversível da membrana (Santos, 1999).

Distúrbios das propriedades funcionais das células, causados pelo congelamento, ocorrem especialmente em células parenquimáticas de parede fina de frutos com a 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). Em casos extremos, um ou mais sais dissolvidos no fluido celular podem precipitar, o que pode levar a mudanças no pH e mudar a conformação, estado de agregação e funcionalidade das macromoléculas.

Em tecidos dos talos de uvas é pouca a desidratação induzida pelo congelamento a  $-45^{\circ}\text{C}$ , indicando extrema resistência à deformação celular. A resistência celular à deformação em folhas é muito menor do que a observada nos

talos. Tipicamente, um aumento na rigidez resulta em uma redução na desidratação celular (Rajashekar e Burke, 1996).

Na formação de cristais intracelulares nenhuma ou poucas células encolhem; o tecido pode parecer não alterado após descongelamento, porém, microscopicamente, todas as células podem estar mortas devido aos danos às estruturas subcelulares (Schäfer e Kaufmann, 1999). A formação de cristais intracelulares, qualquer que seja seu tamanho, destrói a organização interna das células, alterando o seu metabolismo e provocando sua morte (Cheftel, Cheftel e Besançon, 1982).

Nem toda água compartimentalizada congela e descongela à mesma temperatura. O compartimento vacuolar congela sob temperatura de  $-3^{\circ}\text{C}$ , mas, por causa do seu conteúdo biopolimérico mais elevado, o citoplasma e a parede celular requerem temperaturas abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$  para o seu congelamento (Hills e Remigereau, 1997).

Acredita-se que não existe a formação de cristais de gelo entre as bicamadas lipídicas. Gleeson, Erramilli e Gruner (1994) concluíram que se a água incorporada entre as bicamadas fosse congelada, migraria para fora da grade lamelar, talvez para a região intersticial, onde formaria bolsas de gelo.

Geralmente, o congelamento rápido causa mais rupturas e fragmentação das membranas do que o congelamento lento ou intermediário. Grandes células parequimais, altamente vacuoladas, apresentaram um maior grau de desorganização das estruturas protoplasmáticas do que células menores e menos vacuoladas (Partmann, 1975; Edwards e Hall, 1988). Para células com grandes vacuolos, o congelamento ultra-rápido pode ter efeitos benéficos nas mudanças texturométricas. Assim, pêras congeladas em nitrogênio líquido apresentam uma textura mais firme após o descongelamento quando comparadas com pêras tratadas por métodos de congelamento convencionais. A vitrificação causa menos danos, presumivelmente por causa dos componentes celulares, como solutos ionizados

na estrutura das macromoléculas permanecerem mais ou menos em sua relativa posição natural existente em células vivas.

O congelamento ultra-rápido (congelamento criogênico), no entanto, pode causar a letalidade pela formação de cristais de gelo intracelulares ou rachaduras mecânicas, devido a uma contração não uniforme seguida da solidificação ou a ruptura da camada externa congelada quando a região interior congela e expande (Martino et al., 1998). Os produtos de alta densidade (alto conteúdo d'água) e baixa porosidade são geralmente mais susceptíveis a rachaduras do que aqueles com baixa densidade e alta porosidade (Kalichevsky, Knorr e Lillford, 1995).

Mudanças na pressão, durante o processo de congelamento, resultaram na deformação da estrutura celular de maçãs. Esta deformação danificou as junções celulares e estas se desprenderam afetando o comportamento mecânico do tecido (Martínez-Monzó et al., 1998). Células da pele de frangos jovens e conjuntiva de olho humano congeladas com o auxílio de pressão sofreram uma redução em sua viabilidade quando comparadas às amostras que sofreram congelamento convencional. Possivelmente devido à formação de gelo intracelular (Kalichevsky, Knorr e Lillford, 1995).

## **2.7 Danos físico-mecânicos na parede celular de frutos**

A expansão de 9% a 10% no volume da água provoca um estresse compressivo na parede celular e pode causar danos cuja extensão irá depender das propriedades mecânicas da matriz circundante. Componentes elásticos são, normalmente, menos afetados do que os rígidos.

As plantas podem suprimir algum congelamento pela depressão do ponto de fusão ou pelo sub-resfriamento das soluções nos tecidos (Glasstone, 1946). A tolerância à formação de gelo alia-se com a inibição da formação deste em regiões críticas da planta, por exemplo, no protoplasma que não sobrevive a bai-

xas temperaturas (Burke, George e Bryant, 1975; Levitt, 1980). Durante a aclimação, o aumento do conteúdo de açúcares no citoplasma pode contribuir para a crioproteção. Contudo, os vacúolos das células parenquimáticas podem ter menor conteúdo de açúcares do que o citoplasma e isto pode influenciar a nucleação e cristalização da água intracelular (Koster e Lynch, 1992).

Uma barreira à perda d'água e ao crescimento dos cristais de gelo nas células é necessária para que ocorram sub-resfriamento e retardamento da cristalização (Quamme, Su e Veto, 1995). Wisniewski e Davis (1995) hipotetizaram que, devido à natureza higroscópica de alguns tipos de pectina, a parede primária espessada pode promover um conduto para a água mover-se preferencialmente em direção ao gelo extracelular. Concomitantemente, a presença de géis de pectina nos espaços intercelulares pode evitar o crescimento do gelo intruso. Em muitas células, os cristais de gelo foram observados nos vacúolos e não no citoplasma. Isto sugere que membranas celulares internas, tais como tonoplastos, foram impermeáveis ao gelo e impediram o crescimento interno dos cristais.

A alta resistência de ervilhas à degradação texturométrica durante o congelamento quando comparadas com espinafre e feijão verde foi atribuída ao alto conteúdo de amido, abundante estrutura protoplasmática e ao baixo grau de vacuolização nas células parenquimáticas (Mohr, 1974). A imagem de ressonância magnética é sensível à morfologia dos tecidos e órgãos vegetais claramente delimitados (epiderme, tecido vascular, córtex e sementes) que sofrem uma drástica mudança na aparência da imagem após as células terem sido rompidas por congelamento e descongelamento (Duce, Carpenter e Hall, 1992).

Kasahara e Jiménez (1990) investigaram o efeito de crioprotetores sobre a textura e outros parâmetros de chirimoyas submetidas a congelamento. Os tratamentos estudados mostraram um efeito protetor da textura e uma redução no exsudato gerado. Efeito especial apresentou o tratamento com soluções de açúcar e cloreto de cálcio. 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 fluido e melhor textura do material descongelado (Resende, 1995; Resende e Cal-Vidal, 1997).

A velocidade do congelamento afetou a textura de pecans. Os parâmetros mais afetados foram rigidez e fraturabilidade (Anzaldúa-Morales, Brusewitz e Anderson, 1999). Os processos de congelamento e descongelamento levam à desintegração das células, degradação dos pigmentos e isomerização de carotenóides (Bartolome, Ruperez e Fuster, 1996). Temperaturas abaixo de  $-3^{\circ}\text{C}$  tornam-se críticas no congelamento de kiwis e uma exposição mais prolongada a temperaturas neste valor, ou mais baixas, aumenta a probabilidade de nucleação do gelo (Testolin e Costa, 1995). Em tecidos de madjhoul (*Phoenix dactylifera* L.), após congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ , as paredes celulares pareceram rompidas ou desprendidas resultando na formação de espaços entre estas (Shomer et al., 1998). No congelamento de frutos cítricos, o crescimento de grandes cristais de gelo nos espaços entre as bolsas de suco e sua invasão nas paredes epidérmicas levam ao reforçamento das pontes de gelo entre as bolsas. O congelamento rápido evita a injúria ultra-estrutural, mas, ao mesmo tempo, as bolsas expandidas exercem pressão entre si e repelem-se umas às outras, levando à sua separação e à desintegração do invólucro destas (Shomer, 1986).

Wardouwski e Grierson (1972), citados por Hendrix e Ghegan (1980), investigaram padrões de congelamento em laranjas. As membranas delas foram danificadas diferencialmente, se o tipo de congelamento fosse por radiação ou convecção, o que influenciou também o suco concentrado congelado feito com os frutos danificados. Shaw (1984) sugeriu que a determinação do conteúdo de sulfeto de hidrogênio em suco de frutos pode ser um índice para determinar o grau de dano pelo congelamento aos frutos. Um nível reduzido de sulfeto de

hidrogênio indica danos mecânicos às células que permitiram reações enzimáticas, tais como a degradação de metionina ou cisteína a sulfeto de hidrogênio, antes da extração do suco.

Grandes bolhas têm propriedades oxidantes e podem causar também danos mecânicos. 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 (Thomas e Smith, 1994).

## **2.8 Tentativas de redução de danos celulares mediante o monitoramento de cristais de gelo**

### **2.8.1 Monitoramento do número e tamanho de cristais de gelo**

A dimensão dos cristais de gelo ao final do congelamento depende do número de núcleos cristalinos formados inicialmente. Grandes cristais são formados quando há poucos núcleos. Portanto, regulando a nucleação por meio da temperatura e velocidade de congelamento pode-se obter cristais de tamanho desejado. Quando a nucleação é rápida, numerosos nucléolos dão origem a um elevado número de cristais de pequeno tamanho (Leniger e Beverloo, 1975; Reid, 1983; Hartel e Chung, 1993). Uma rápida redução na temperatura (abaixo de  $-40^{\circ}\text{C}$ ) previne o crescimento de cristais de gelo intracelulares pela rápida passagem na zona de temperatura em que ocorre o crescimento letal dos cristais de gelo (Santos, 1999).

Além da velocidade de congelamento, as altas concentrações das soluções exercem influência sobre o processo de cristalização, bem como a dinâmica do processo de difusão. A redução da mobilidade desfavorece agregações de cristais próximos entre si, mantendo-os reduzidos em tamanho e quantidade. É sabido que, aumentando a velocidade de deslocamento de uma solução e/ou reduzindo a viscosidade da solução pelo decréscimo da concentração de soluto,

pode-se aumentar o coeficiente de transferência de massa para ajudar o soluto na interface gelo-solução a ser transportado no corpo fluido (Chen, Chen e Free, 1998).

O processo de congelamento assistido pela utilização de pressão é baseado no comportamento incomum da água sob pressão. A 207 MPa, a água permanece líquida abaixo de  $-22^{\circ}\text{C}$ . O emprego destas condições, seguida por rápida liberação da pressão, dá lugar a uma nucleação quase instantânea na amostra, devido ao sub-resfriamento uniforme e ao equilíbrio instantâneo da pressão nas fases sólida e líquida (Martino et al., 1998). O crescimento é então completado sob pressão atmosférica. Este processo é realizado com o objetivo de obter cristais de gelo do tipo III, que se apresentam como cristais menores e com densidade levemente acima do valor para a água líquida (Sanz et al., 1997; Lévy et al., 1999; Chevalier, Bail e Ghoul, 2000a,b).

Crioprotetores geralmente reduzem o tamanho dos cristais de gelo e alteram ou reduzem o colapso celular, substituindo a água em sua ausência (Thomas e Smith, 1994). Géis preparados com surimi e com um baixo nível de crioprotetores 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 espaços menores e numerosos provocados pelos cristais. A adição de 8% de sorbitol resultou em uma maior habilidade para a retenção d'água, uma maior força no gel e uma menor formação de cristais de gelo (Yoon e Lee, 1990).

Alguns estudos lançaram dúvidas na habilidade dos hidrocolóides em controlar o tamanho dos cristais de gelo em sobremesas congeladas. Cottrell, Pass e Phillips (1979) encontraram que certos polissacarídeos usados como estabilizantes em sorvetes exerciam somente um controle mínimo sobre o crescimento do cristal de gelo em sorvetes estocados a  $-35^{\circ}\text{C}$  por 16 semanas. Todos os hidrocolóides foram retardantes ineficientes no crescimento do cristal quando

comparados com a sacarose. Aumentando-se a viscosidade da solução ocorre um decréscimo na velocidade linear de cristalização, contudo, as curvas diferem em forma, inclinação e posição, dependendo do hidrocolóide(s) usado(s) e com a presença ou ausência de sacarose (Budiaman e Fennema, 1987; Buyong e Fennema, 1988).

Sistemas de soluções-modelo contendo polissacarídeos estabilizadores apresentaram uma estrutura de malha característica quando congelada que foi alterada pela adição de sacarose. Sorvetes estabilizados apresentaram diâmetro médio de cristais de gelo menor do que amostras não estabilizadas (Caldwell, Goff e Stanley, 1992). Os polissacarídeos promoveram um efeito protetor durante o crescimento de cristais de gelo na fabricação de sorvetes e estocagem a temperaturas flutuantes. O tamanho inicial e a velocidade de crescimento dos cristais de gelo foram reduzidos em sorvetes estabilizados (Goff, Caldwell e Stanley, 1993). A adição de dextrana em sorvetes sob agitação resultou em um efeito protetor mais pronunciado devido ao resultado de interações entre a dextrana, proteínas do leite e outros estabilizadores. A adição de dextrana efetivamente aumentou a  $T_g$  do sorvete, o que indica seu potencial como crioprotetor (McCurdy, Goff e Stanley, 1994).

A Unilever (1993) desenvolveu um método para controlar a espessura de cristais de gelo dendríticos para não excederem 100  $\mu\text{m}$  e preferencialmente não excederem 60  $\mu\text{m}$ . Um cristal menor é obtido alterando-se a formulação com substâncias de peso molecular médio mais alto. Por exemplo, adoçantes convencionais, como sacarose e dextrose, são trocados por xarope de milho para atingir este propósito. A maltodextrina pode ser também utilizada. O uso de materiais de peso molecular mais elevado força a água a solidificar como uma massa amorfa. A temperatura de transição vítrea dos produtos obtidos normalmente se encontra a  $-18^\circ\text{C}$  e, em particular, a  $-13^\circ\text{C}$ . Durante o congelamento de soluções contendo inibidores de cristalização, os cristais de gelo e a solução líqui-

da sub-resfriada são formados, a última solidificando em uma massa vítrea à medida em que a temperatura decresce (Flink, 1975, Mackenzie, 1975b e Simatos, 1976).

Miyawaki, Abe e Yano (1992) observaram o efeito de materiais coexistentes com o gelo, tais como sacarose (modificadora da atividade d'água), cloreto de sódio (estruturante) e uréia (desestruturante). A adição destes materiais a um nível de 5% aumentou substancialmente o tamanho dos cristais de gelo. A adição de um tensoativo (Triton X-100, 5%), em combinação com a sacarose, contudo, inibiu consideravelmente o aumento em tamanho dos cristais, provavelmente por causa da inibição da taxa de transferência de massa d'água para a interface gelo-líquido. Um agente como o Triton X-100 pode ser adsorvido à interface entre o gelo e a solução e retardar a difusão molecular à interface até que o tamanho do gelo decresça (Bae, Miyawaki e Yano, 1993).

### **2.8.2 Possibilidades de mudanças na estruturação e morfologia de cristais de gelo**

A morfologia de cristais de gelo tem sido observada por alguns pesquisadores, com o monitoramento da velocidade e do tempo de congelamento (Shirai et al., 1985; Miyawaki e Bae, 1994; Fuchigami et al., 1994).

Congelamentos rápidos e ultra-rápidos costumam produzir cristais esféricos. Dos respectivos núcleos partem agulhas de gelo muito finas que, na sua forma externa, constituem uma esfera. Aumentando-se, todavia, a velocidade de congelamento, estas agulhas se fazem cada vez mais delgadas e o cristal acaba por tornar-se transparente. No congelamento de tecido biológico prevalecem os dendritos irregulares (Woinet, Andrieu e Laurent, 1997). A velocidade de congelamento geralmente utilizada na prática é demasiadamente alta para que se possam formar cristais hexagonais regulares (Gruda e Postolski, 1981).

A velocidade de liberação da pressão no congelamento pode influenciar a morfologia dos cristais de gelo. Uma lenta liberação provocou a formação de cristais irregulares e sem orientação específica, enquanto uma rápida liberação da pressão promoveu cristais mais largos, em forma de agulhas, orientados radialmente e com um notável gradiente de tamanho da superfície da amostra para o centro (Lévy et al., 1999).

Diz-se que principalmente os cristais em forma de agulhas danificam mecanicamente as estruturas celulares. A forma dendrítica dos cristais de gelo em um meio contendo colágeno pode ser influenciada por variações na concentração do soluto em suspensão, e parâmetros de congelamento como gradiente de temperatura e velocidade da frente congelante. Usando ácido acético como aditivo, o gradiente de temperatura pode ser ajustado entre 40 e 50 K/cm para a formação de dendritos sem ramificações laterais. No caso de etanol, o gradiente de temperatura pode ser ajustado entre 25 e 50 K/cm para atender a este critério. Nas faixas mencionadas, o colágeno agregado foi rejeitado do avanço da frente de gelo e se depositou nas áreas não cristalizadas entre os cristais de gelo. A rejeição dos agregados de colágeno pode ter sido causada pela anisotropia do gelo (Schoof et al., 2000).

Na presença de núcleos submicroscópicos de gelo, discos planos são formados. A um pequeno sub-resfriamento, a forma arredondada é preservada; com um maior sub-resfriamento, o crescimento na direção do eixo *a*, plano basal, torna-se dominante e uma aparência hexagonal é observada. Um maior aumento do sub-resfriamento provoca uma maior troca de calor formando-se vértices protundentes (Quervain, 1975). Intenso sub-resfriamento produz finos cristais de gelo devido à nucleação secundária e resulta em uma morfologia dendrítica e irregular (Suzuki e Hagura, 1997). No congelamento lento de 4 ml de água destilada que apresentou um subresfriamento de  $-5,9^{\circ}\text{C}$ , os primeiros cristais formados foram discos planos (Figura 34) de tamanho variado (Carneiro, 1997).

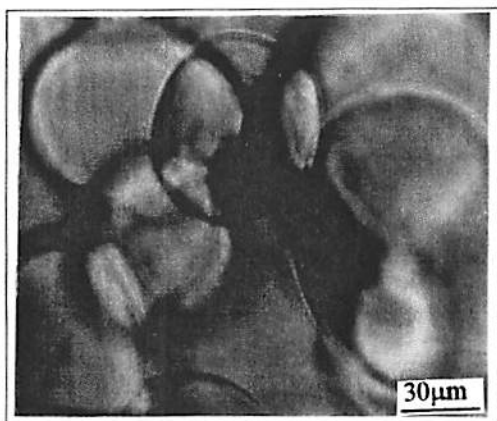


FIGURA 34 Cristais de gelo em forma de discos fotomicrografados ao microscópio óptico com luz polarizada. Primeiros cristais formados no congelamento de água destilada (Carneiro, 1997).

Ohsaka e Trinh (1998) encontraram a morfologia dos cristais de gelo mudando de discos circulares a discos perturbados e, então, a um crescimento dendrítico. O tipo dendrítico geralmente avança ao longo do plano basal. Ao final, a forma global hexagonal é preservada. As mesmas mudanças em morfologia foram encontradas por Tirmizi e Gill (1987). Estes autores observaram que a morfologia dos cristais de gelo depende do grau de sub-resfriamento e do tempo decorrido até o início do crescimento livre.

Proteínas podem funcionar como nucleantes de gelo para iniciar a formação de gelo extracelular e as AFPs (Antifreeze Proteins) modificar os cristais de gelo que se formam fora das células (Hon et al., 1995). Baixas concentrações (nM) de AFP inibem o crescimento do gelo ao longo do eixo a de tal modo que as faces do prisma hexagonal do cristal se tornam evidentes. Em uma maior concentração ( $\mu\text{M}$ ) de AFP, o cristal cresce predominantemente ao longo do eixo c

para formar bipirâmides hexagonais e cristais em forma de agulhas. As AFPs se adsorvem nos cristais de gelo para modificar seu crescimento normal (Feeney e Yeh, 1993). 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 (Griffith et al., 1992).

Maruyama, Ashida e Knight (1999) concluíram que gases dissolvidos na água não são significantes na determinação da morfologia do gelo. A pressão atmosférica ou a vácuo, facetas prismáticas não são formadas durante o crescimento deste e as interfaces do gelo paralelas ao eixo  $c$  apresentam-se rugosas. Eles encontraram cristais na forma de disco com seu eixo  $c$  vertical, crescendo sem nenhuma face prismática e sem instabilidades interfaciais até vários mm em diâmetro.

Estudos recentes estão sendo voltados para a estruturação de cristais de gelo por meio de substâncias que podem ser infundidas em frutos com o poder de modificar a disposição das moléculas d'água no estado cristalino. A mudança em morfologia dos cristais é um fator de grande relevância porque caracteriza o tipo de interação cristal-célula. Açúcares, isolados ou em combinação, promoveram estruturações que variaram entre uma configuração do tipo hexagonal (Figura 35a) a arbórea (Figura 35b), em que longos ramos cresceram a partir de um tronco axial com ângulos de  $60^\circ$ . Vitaminas anfilílicas favoreceram a formação do tipo micela (Figuras 35c e 35d) e diferentes aminoácidos apresentaram formas hexagonais (Figuras 35e e 35f) e alongadas, com uma possível influência de sua polaridade (Carneiro, 1997; Cal-Vidal e Carneiro, 2000; Cal-Vidal e Carneiro, 2001; Carneiro e Cal-Vidal, 1998a,b; Carneiro e Cal-Vidal, 2000a,b,c; Carneiro e Cal-Vidal, 2001).



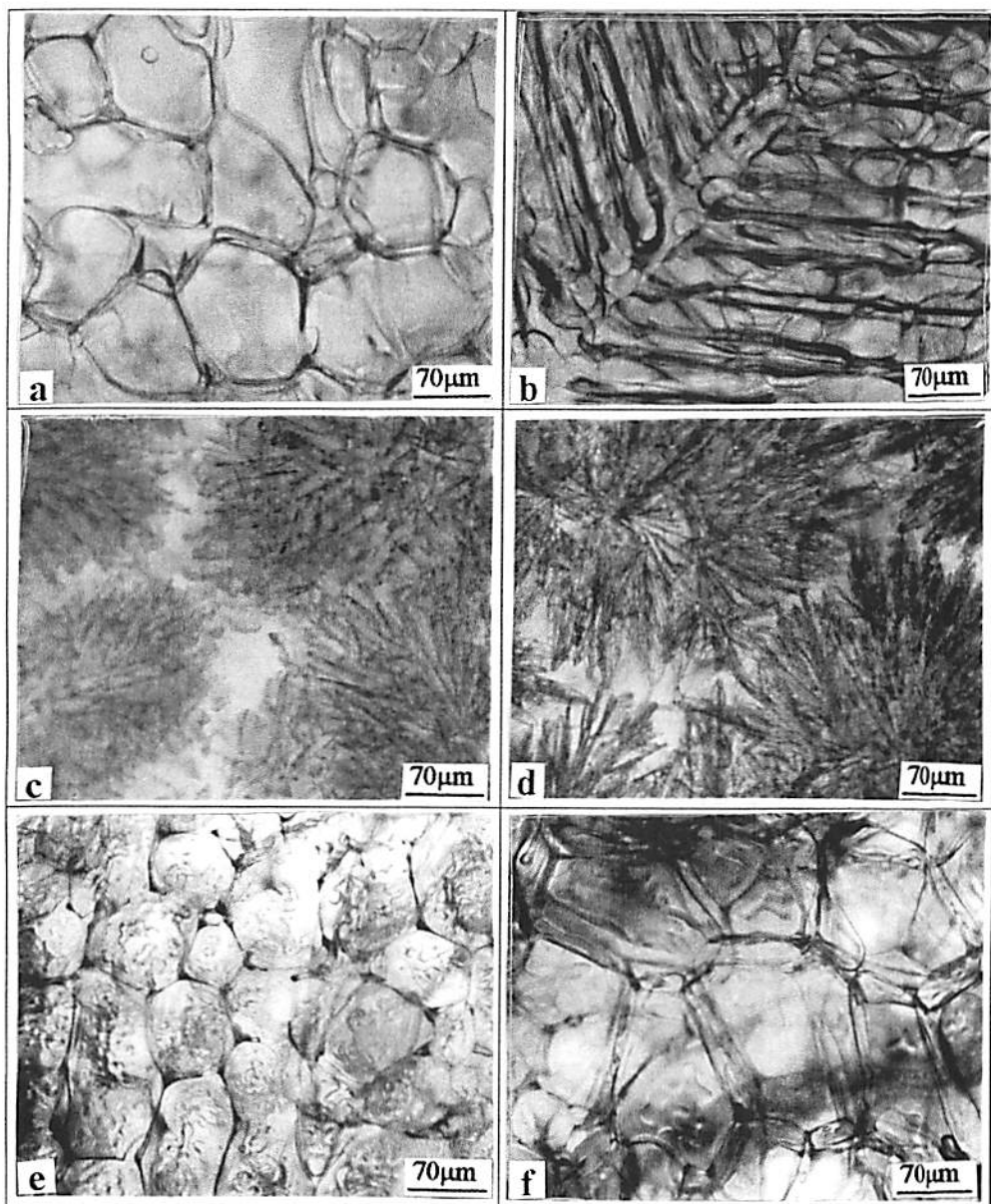


FIGURA 35 Estruturação de cristais de gelo ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) em soluções aquosas contendo a) glicose 5%, b) arabinose1: xilose2 20%, c) piridoxina 15%, d) creatina 1%, e) arginina 5% e f) lisina 1% (Carneiro, 1997).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Congelamento de soluções-modelo

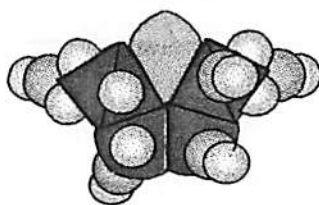
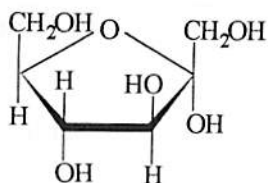
Soluções-modelo contendo substâncias diversas (açúcares, aminoácidos e vitaminas), em diferentes concentrações (Tabela 2), foram congeladas em placas de Petri (25 mm  $\phi$  x 150 mm *h*) em um congelador (Metalfrio, São Paulo-Brasil) até  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram distribuídos 4 ml de solução em cada placa que atingiram a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  em torno de 1 hora e 30 segundos, mas as placas foram deixadas por duas horas no congelador. A natureza químico-estrutural de cada substância empregada encontra-se na Figura 36 e as estruturas físicas correspondentes na Figura 37. Os cristais de gelo foram fotomicrografados 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 filtro polarizador (Olympus U-Pot, Japão). O congelamento foi realizado em triplicata, ou seja, foram analisadas três plaquinhas de cada concentração de uma determinada substância. De cada uma delas foram obtidas quatro ou mais fotografias, dando um total de, no mínimo, doze fotos por concentração e 48 fotos por substância. As amostras, fotografadas à temperatura ambiente, eram descartadas tão logo iniciava-se a fusão (em torno de 30 a 60 segundos).

TABELA 2 Substâncias empregadas nas soluções-modelo submetidas a congelamento.

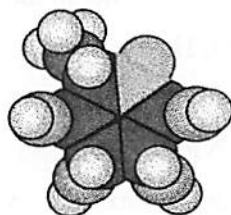
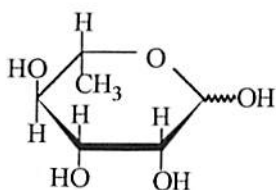
Substâncias	Concentrações (%)*						
Frutose [Synth] $C_6H_{12}O_6$	1,0	5,0	10,0	15,0			
$\alpha$ -L-Raminose monoidratada [Sigma] $C_6H_{12}O_5 \cdot H_2O$	1,0	5,0	10,0	15,0			
Riboflavina [CRQ] $C_{17}H_{20}N_4O_6$	0,25	0,5	0,75	1,0			
Ácido 4-aminobenzóico [Vetec] $H_2NC_6H_4CO_2H$	0,5	0,75	1,0	3,0			
Ácido aminoacético (Glicina) [Synth] $C_2H_5NO_2$	0,25	0,5	0,75	1,0			
Cloridrato de L-cisteína [Synth] $C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$	1,0	3,0	5,0	7,0			
Ácido L-aspártico [Vetec] $C_4H_7NO_4$	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	3,0	5,0
Ácido L-glutâmico [Vetec] $C_5H_9NO_4$	1,0	3,0	5,0	7,0			
L-prolina [Baker] $C_5H_9NO_2$	1,0	3,0	5,0	7,0			
DL-metionina [Baker] $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5		

\*g substância/100 g d'água

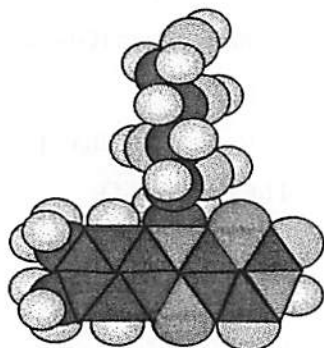
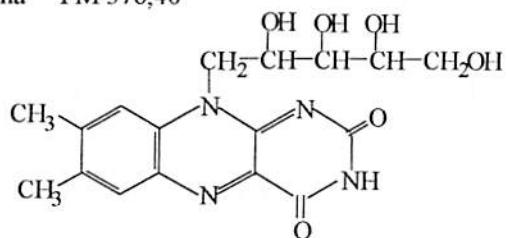
Frutose PM 180,16



Raminose PM 164,20



Riboflavina PM 376,40



Ácido 4-aminobenzóico PM 137,14

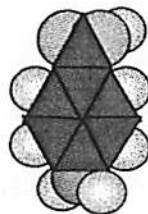
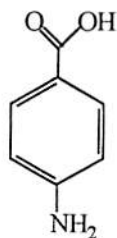
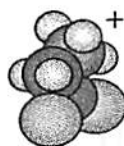
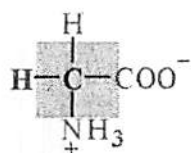
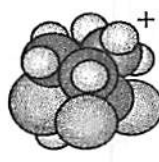
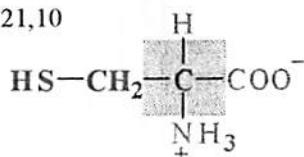


FIGURA 36 Natureza químico-estrutural das substâncias utilizadas nas soluções-modelo (continua).

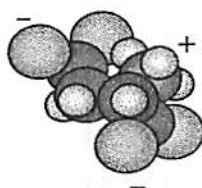
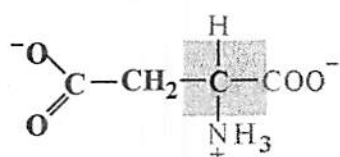
Glicina PM 75,07



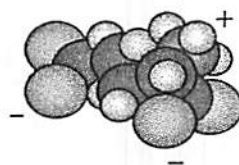
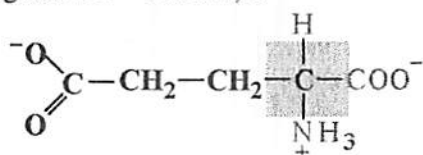
Cisteína PM 121,10



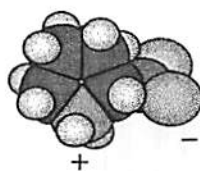
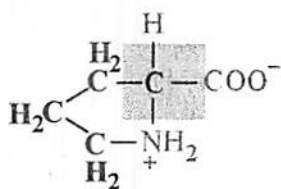
Ácido aspártico PM 133,10



Ácido glutâmico PM 147,13



Prolina PM 115,13



Metionina PM 149,21

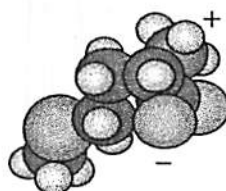
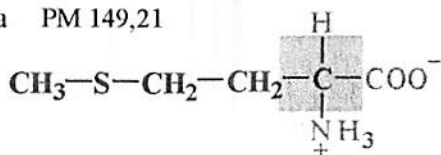


FIGURA 36, Cont.

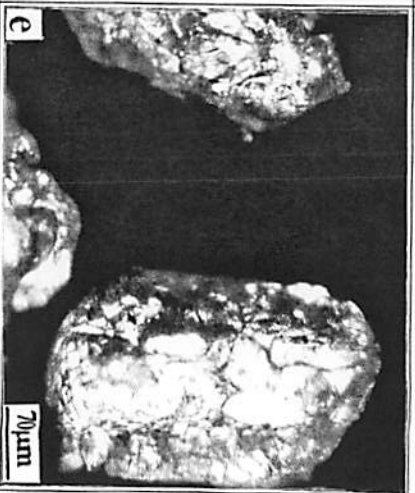
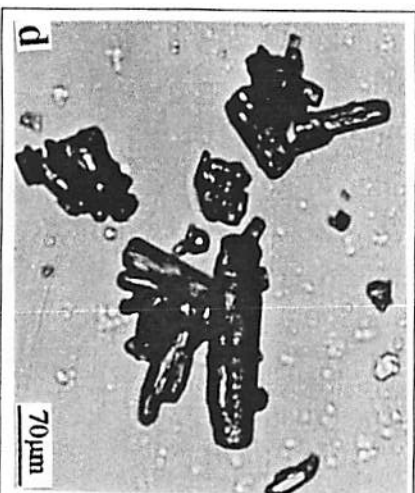
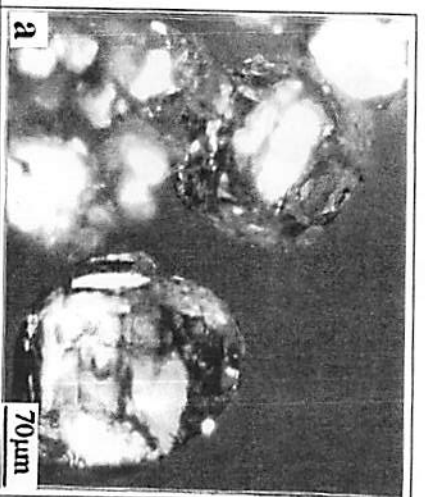


FIGURA 37 Estrutura física das substâncias empregadas fotomicrografadas ao microscópio ótico com luz polarizada. a) frutose; b) raminose; c) riboflavina. d) ácido 4-aminobenzóico, e) glicina (continua).

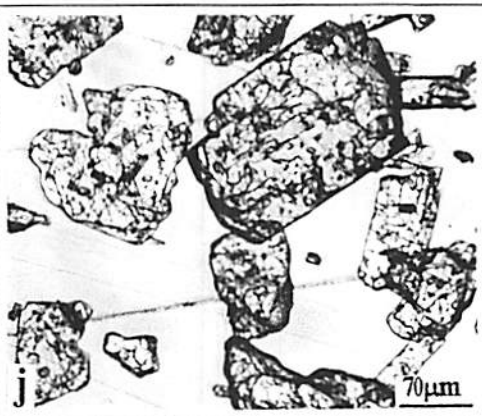
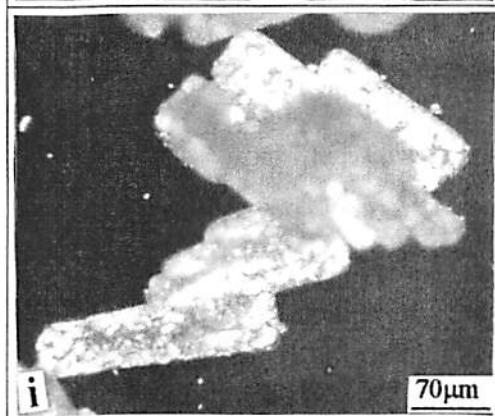
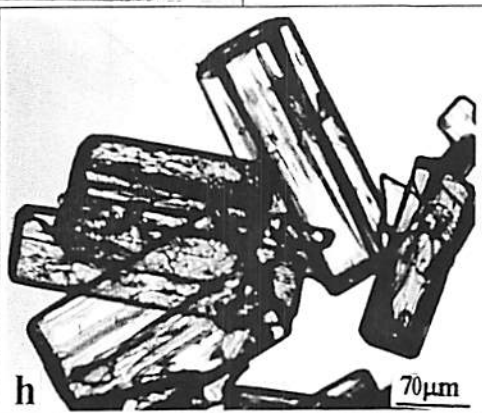
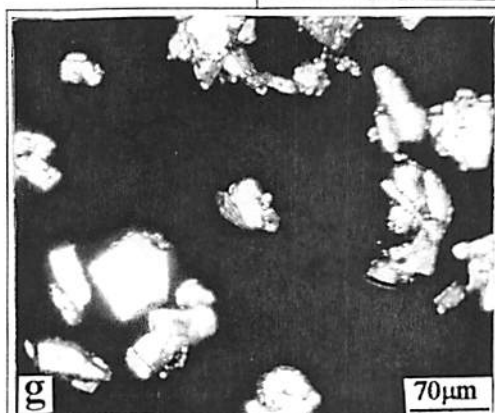
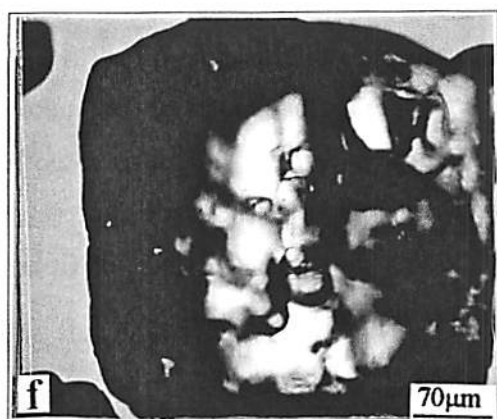


FIGURA 37, Cont. f) cisteína, g) ácido aspártico, h) ácido glutâmico, i) prolina, j) metionina.

### 3.2 Preparação das amostras para microscopia ótica (MO)

Foram utilizados tecidos parenquimáticos do mesocarpo de mamão (*Carica papaya*), variedade papaya da cultivar “Sunrise Solo” (12,63°Brix) com cor 2.5YR 7/12 e caqui (*Diospyros kaki*) variedade chocolate do tipo Variável (14,2°Brix) cor 7.5YR 7/12, segundo Munsell Book of Color e tecido epidérmico de cebola (*Allium cepa*) branca (Figura 38).

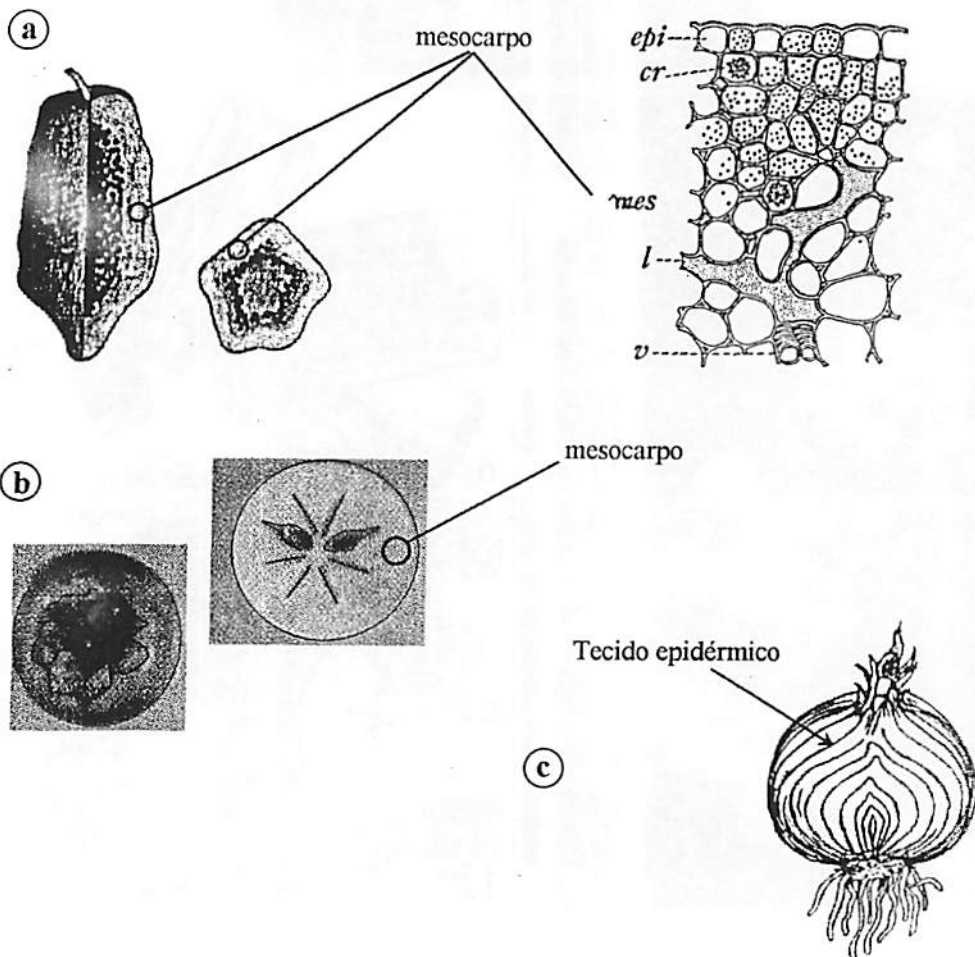


FIGURA 38 Tecidos utilizados para congelamento de a) mamão; b) caqui e c) cebola. *epi*= epicarpo, *cr*= cristal de oxalato, *mes*= mesocarpo, *l*= tubo latex, *v*= tecido fibrovascular (Winton e Winton, 1949).



Utilizou-se o processo de infusão a vácuo (0,5 atm) à temperatura ambiente (22°C) por 24 horas para incorporar as substâncias (Tabela 3) em solução aquosa de 20% (concentração inicial) em pedaços de frutos, anteriormente ao congelamento dos mesmos, visando influenciar a estruturação da água durante a cristalização.

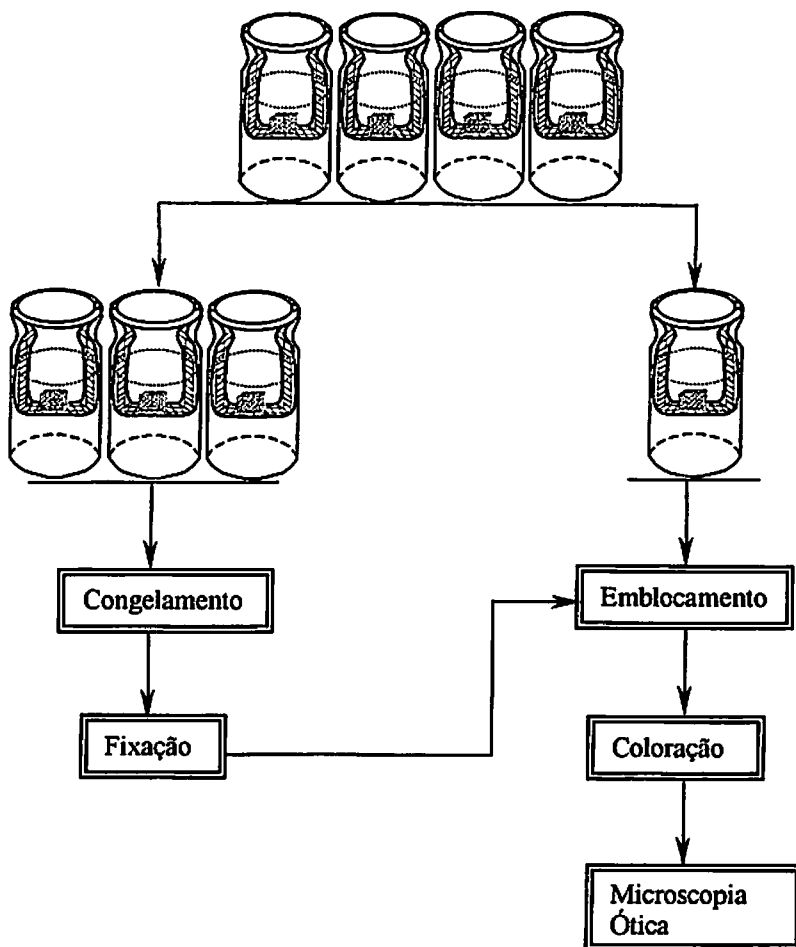
TABELA 3 Substâncias infundidas nos frutos.

Substâncias	Concentração (%)*
Frutose	20
Riboflavina	~20
Glicina	20
Lisina	20
Prolina	20

\*Valor inicial da solução em g substância/100 g d'água

Os frutos e bulbos foram cortados em cubos com arestas de 10mm (1 cm<sup>3</sup>) e colocados em frascos, separadamente, contendo 5 ml da solução. Foi utilizada uma malha vazada para que os frutos ficassem suspensos na solução (Figura 39).

Os cubos que sofreram infusão, e uma amostra controle, foram congelados (congelamento lento em ar estático) em placas de Petri a -20°C, por seis horas.



**FIGURA 39** Fluxograma das etapas para MO seguintes à infusão dos blocos de frutos.

Os cubos de frutos, após congelamento, foram imersos em fixador FAA (formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool etílico 70%, 1:1:18 v/v), 40 vezes o volume do tecido, que se encontrava dentro do congelador à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , por quatro horas. Após este período, foram mantidos no fixador por

20 horas à temperatura ambiente para assegurar penetração suficiente do agente fixativo que atua principalmente por introduzir novas ligações cruzadas entre e nas moléculas dos tecidos constituintes, assim imobilizando suas estruturas. As amostras fixadas foram desidratadas utilizando-se uma série alcoólica crescente (Tabela 4), substituídas em xilol e embebidas em parafina. Foram emblocados três cubos de frutos para cada tratamento mais amostras controle.

**TABELA 4** Etapas do emblocamento

---

**Desidratação alcóolica**

álcool etílico	70% – 20 min
	80% – 30 min
	90% – 30 min
	100% – 60 min
	100% – 60 min

**Substituição por solvente**

álcool + xilol	3:1 – 40 min
	1:1 – 40 min
	1:3 – 40 min
xilol puro	30 min
	30 min

**Impregnação com parafina**

xilol saturado com parafina	40 min (temperatura ambiente)
xilol saturado com parafina	20 min (55°C)
xilol + parafina	20 min (57°C)
parafina pura	12 horas (60°C)

---

Foram obtidas seções de 18 $\mu$ m em micrótomo rotativo (Reichert-Wien). As fitas com seis cortes foram aderidas a lâminas de vidro com adesivo de HAUPT sobre placa aquecida (30°C) e secas em estufa a 40°C por 24h.

Após este período, os cortes foram corados segundo o método de Sakai (1973), citado por Kraus e Arduin (1997): as lâminas foram mergulhadas em azul de toluidina por 45 minutos, sob temperatura ambiente, lavadas três vezes em água destilada e secas à temperatura ambiente por 24 horas. Os cortes foram desparafinizados em xilol puro (três vezes com intervalos de 30 minutos), secos a temperatura ambiente e as lâminas montadas em bálsamo do Canadá.

### **3.3 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Partindo de cubos de frutos (1000 mm<sup>3</sup>) submetidos às mesmas condições de congelamento e infusão descritas para microscopia ótica, foram obtidos cubos menores (1 mm<sup>3</sup>) que foram fixados em 1 ml de uma mistura aldeídica (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2,5%; cloreto de cálcio 0,001 M e tampão cacodilato de sódio 0,05 M) por 24 h a temperatura ambiente. Após este período, foram lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 h à temperatura ambiente, lavados em água destilada, contrastados com acetato de uranila 0,5%, desidratados com acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e embebidos em resina Spurr macia para permitir o corte extremamente fino (7.10<sup>-2</sup>  $\mu$ m) em um ultramicrótomo (Reicher-Leica), como esquematizado na Figura 40.

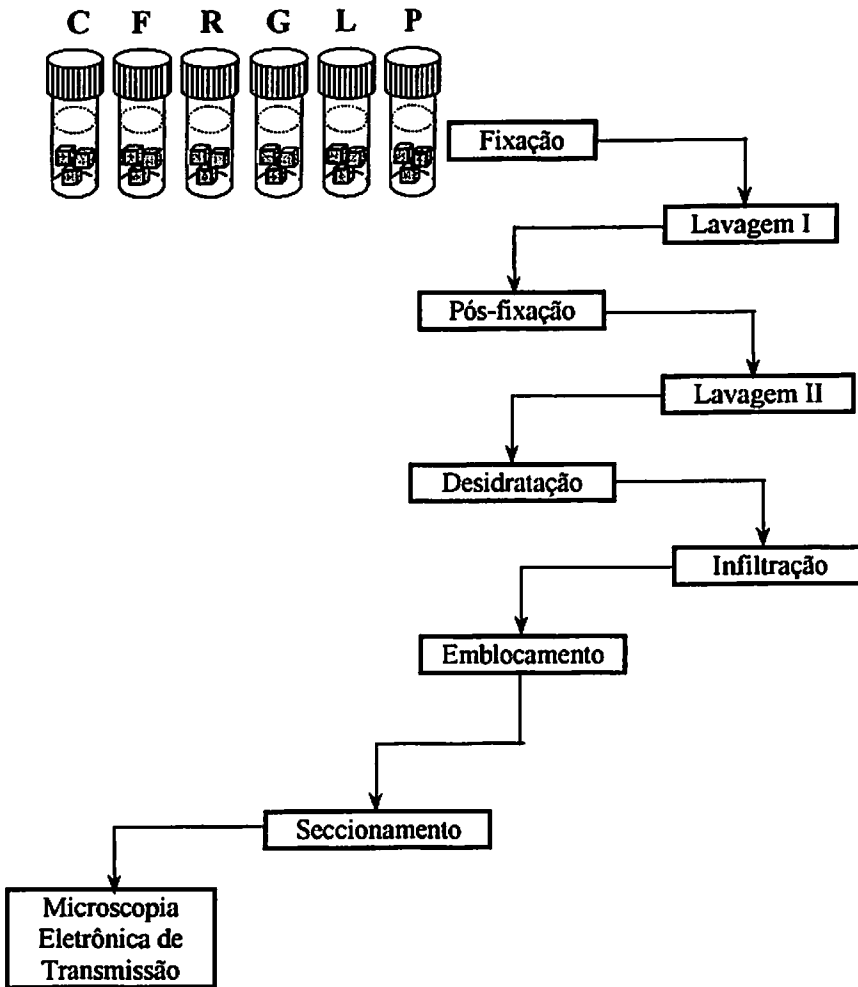


FIGURA 40 Fluxograma das etapas para MET seguintes à fixação dos blocos de frutos, sendo C= controle, F= frutose, R= riboflavina, G= glicina, L= lisina e P= prolina.

### 3.4 Observações microestruturais

#### 3.4.1 Microscopia ótica

Os cortes de frutos, montados em lâminas de vidro, foram observados e fotomicrografados 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). De cada bloco (três para cada amostra) foram preparadas quatro lâminas com fitas de seis voltas e de cada lâmina foram obtidas três fotos do centro de diferentes campos centrais, como esquematizado na Figura 41, resultando em um total de 27 fotos por tratamento. A extensão de danos ao tecido e células individuais foi correlacionada com as possíveis morfologias dos cristais de gelo provocadas pela infusão das substâncias descritas anteriormente.

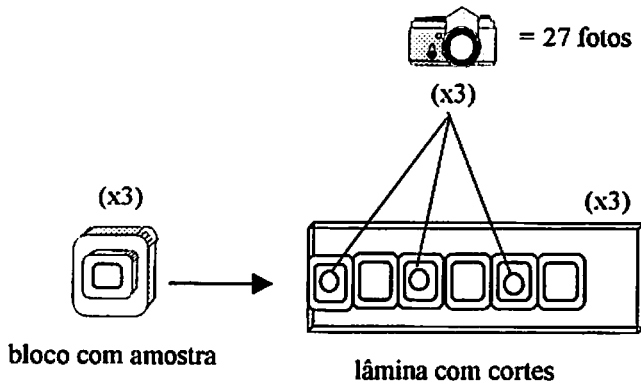


FIGURA 41 Esquematização de fotomicrografias obtidas de tecido de frutos congelados, ao microscópio ótico com contraste de fase.



### 3.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Os cortes ultra-finos depositados sobre telinhas de cobre foram fotomicrografados utilizando-se a câmera do microscópio eletrônico de transmissão (MET Zeiss EM900). As imagens mais detalhadas auxiliaram na investigação de estruturas danificadas ou não pelos cristais de gelo.

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1 Estruturação de cristais de gelo

Os cristais de gelo formados em água destilada apresentaram uma estruturação hexagonal das moléculas d'água (Figura 42) embora com distorções mas mantendo, em sua maioria, um ângulo de simetria de  $60^\circ$ . Distorções são comuns em todos os cristais, independentemente de sua natureza química. À mesma temperatura, ângulos similares normalmente permanecem constantes, apesar do tamanho ou forma do cristal (Kraus, Hunt e Ramsdell, 1959). Assim, assumimos que cristais que mantiveram vértices de aproximadamente  $120^\circ$  ou apresentaram-se arredondados constituem irregularidades no sistema hexagonal ou transições na cristalografia dos mesmos.

#### 4.1.1 Estruturação do gelo na presença de açúcares

Na Figura 43 vê-se o comportamento do açúcar frutose na estruturação de cristais de gelo. Na concentração de 1% (Figura 43A) aparecem cristais do tipo hexagonal, aparentemente sem rugosidades em sua superfície. Se a velocidade de crescimento dos cristais de gelo decresce, como acontece na adição de açúcares, a superfície dos cristais tendem a tornarem-se lisas (Hartel e Chung, 1993). Apesar de seu peso molecular relativamente alto, é grande a solubilidade da frutose, sendo esta facilmente arranjada na grade cristalina. Com o aumento de sua concentração (5% e 10%) em solução aquosa foi promovido um aumento na nucleação do gelo e, conseqüentemente, redução no tamanho dos cristais (Figura 43B e C). Com um maior aumento na concentração (15%), as moléculas de frutose induziram a formação de cristais dendríticos, forçando o alinhamento das moléculas d'água e do soluto (Figura 43D).



Comportamento semelhante pode-se observar em soluções aquosas contendo raminose (Figura 44). No entanto, este açúcar, apesar de ser uma hexose, dispõe de menos sítios de ligação com a água. Isto faz com que, em menor concentração do que a frutose, as moléculas d'água se alinhem juntamente com o soluto formando longos braços, facilitados também por seu peso molecular menor e conseqüente maior difusão no meio do que a frutose.

Através dos grandes e transparentes cristais hexagonais (Figuras 43A e 44A) estruturados pelos açúcares, podem-se observar cristais em camadas inferiores. Tal fato indica que estes cristais têm pouco desenvolvimento ao longo do eixo c, ou seja, são cristais 'achatados', porém, não planos, podendo-se perceber um certo abaulamento nestes. A incorporação de uma molécula d'água a uma face prismática resulta em um maior ganho em energia livre do que se esta ocupasse uma posição na face basal. Portanto, o crescimento radial, perpendicular ao eixo c, é preferido (Quervain, 1975).

Apesar das ramificações (Figuras 43D e 44C e D), os cristais de gelo não se apresentaram em forma de agulhas e sim pequenos cristais arredondados ordenados um após o outro.

Foi encontrado comportamento semelhante de cinco açúcares em solução aquosa frente ao congelamento, dois deles no presente estudo e três em estudos anteriores (Carneiro, 1997), com pequenas variações quanto as concentrações nas quais a estruturação dos cristais de gelo passam por uma transição entre hexagonal regular e dendrítico. Variações entre interações de açúcares com a água devem-se ao número de grupos -OH e suas configurações moleculares (Suggett, 1976; Chinachoti, 1993). Foi demonstrado que os açúcares que ciclizam como hexoses, caso aqui da raminose, apresentam melhor distribuição de seus radicais na grade cristalina, assumindo uma morfologia mais definida dos cristais de gelo.

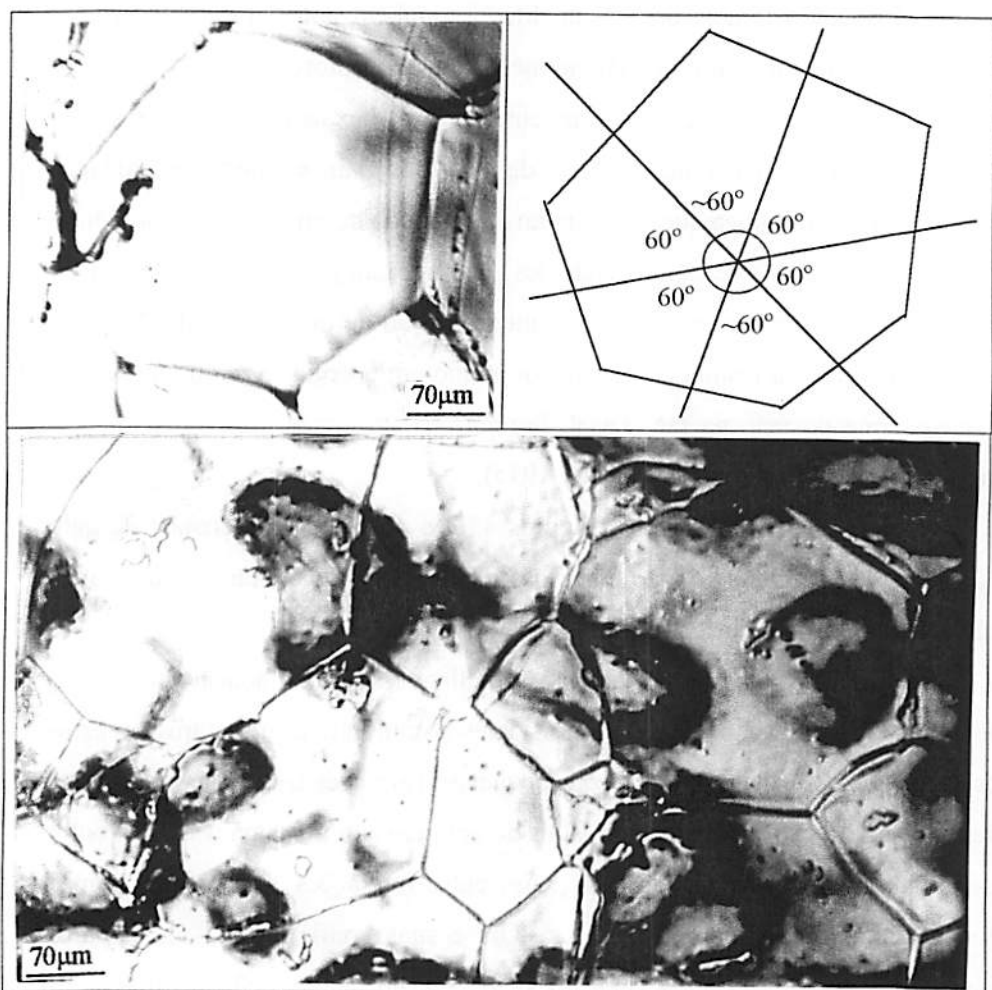


FIGURA 42 Estruturação de cristais de gelo em água destilada ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) fotomicrografada ao microscópio ótico com luz polarizada. Apesar das distorções, os ângulos entre os eixos de simetria mativeram-se próximos aos  $60^{\circ}$ .

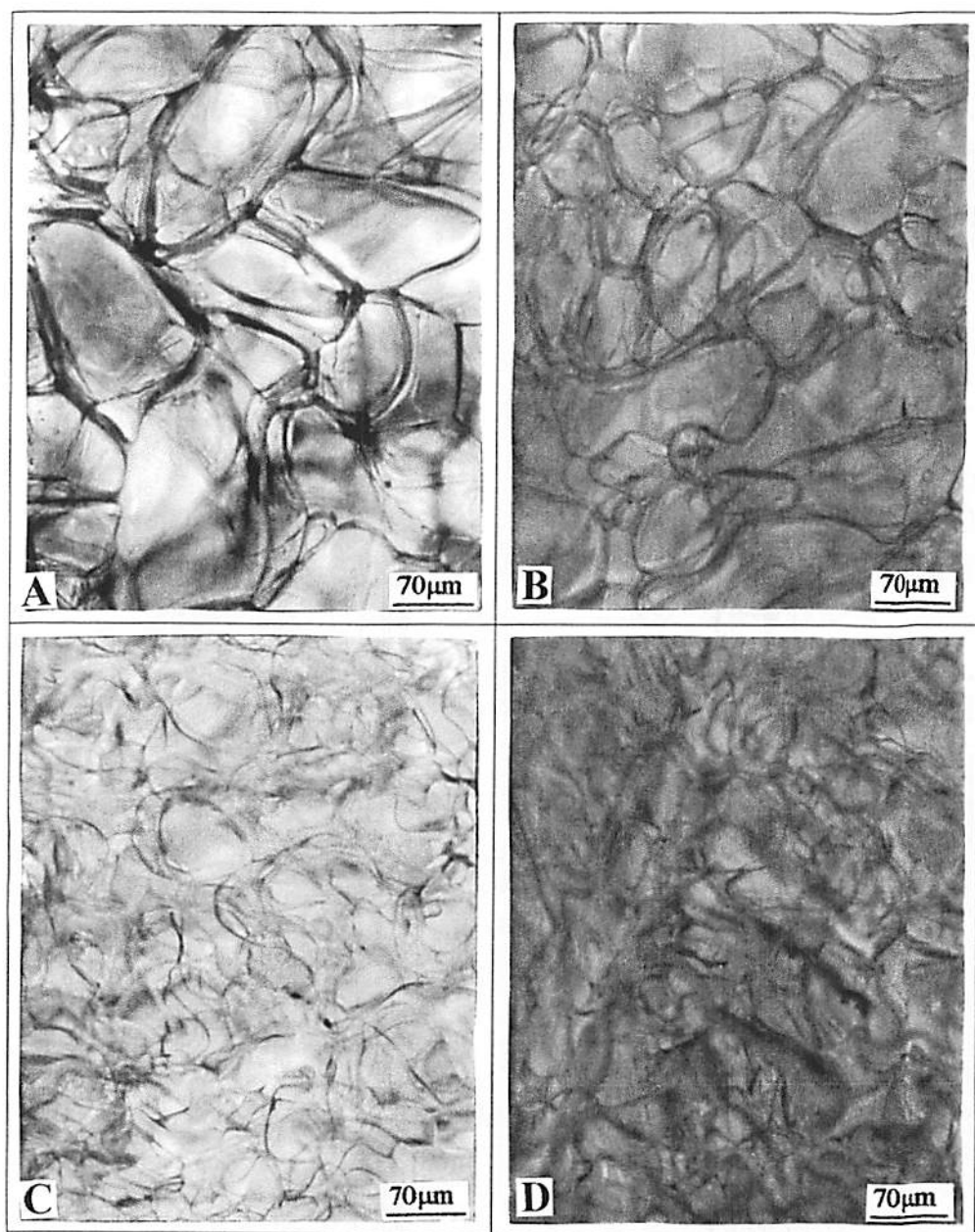


FIGURA 43 Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo frutose nas concentrações de A) 1%, B) 5%, C) 10% e D) 15%.

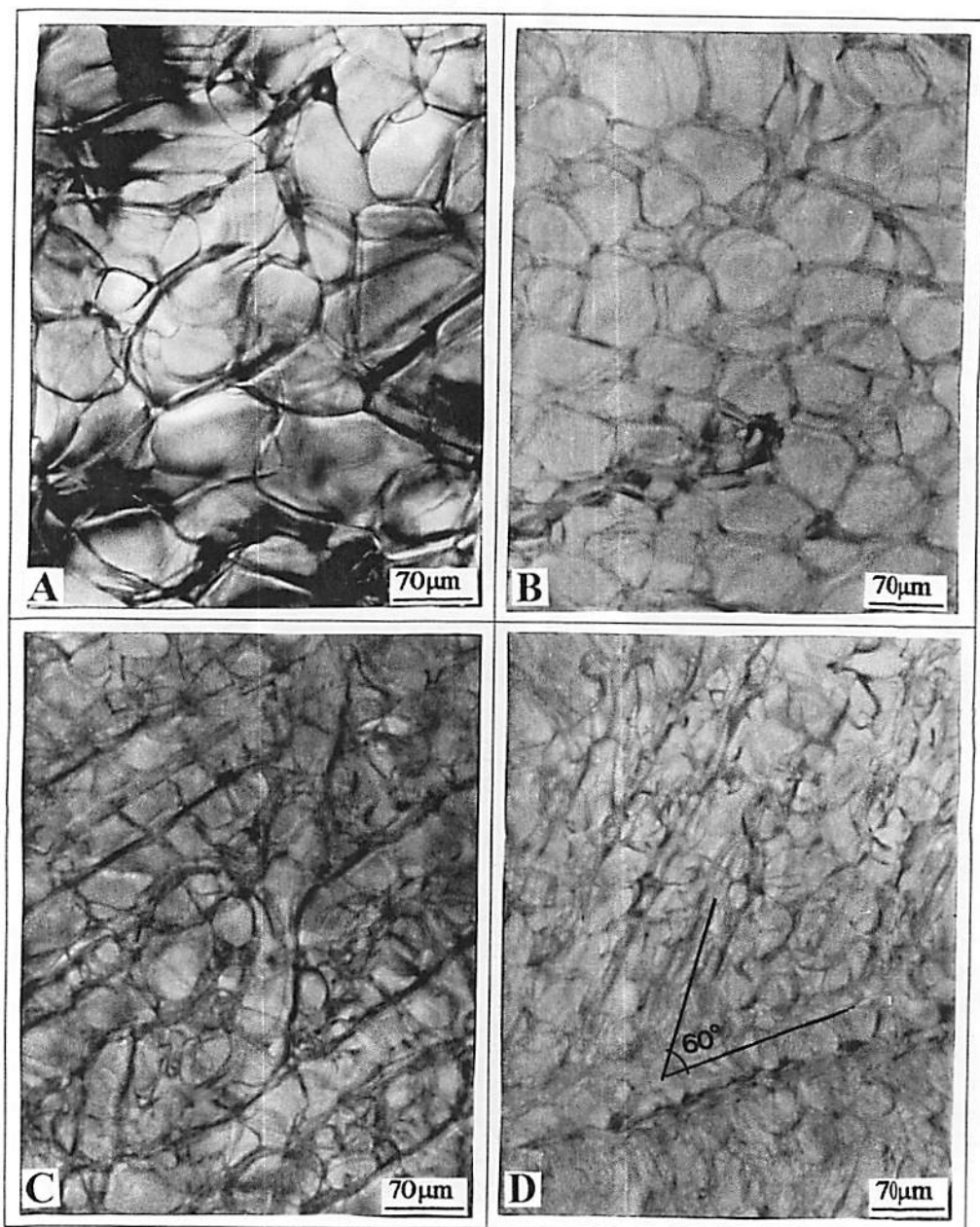


FIGURA 44 Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo **ra-**  
**minose** nas concentrações de A) 1%, B) 5%, C) 10% e D) 15%.

#### 4.1.2 Influência da riboflavina e do ácido 4-aminobenzóico na estruturação de cristais de gelo

A molécula de **riboflavina** (vitamina B<sub>6</sub>) apresenta em sua estrutura uma cadeia principal cíclica, isoaloxazina e outra lateral, ribitol, contendo quatro possibilidades para formar pontes de hidrogênio (Figura 36), o que contribui para a sua solubilidade em água (13 g/100gH<sub>2</sub>O). Sua forma cristalina é muito menor do que das demais substâncias estudadas (Figura 37c). Pode-se observar no comportamento da riboflavina, que esta tem mais afinidade com a água do que com outras moléculas do mesmo soluto. Isto porque os cristais de riboflavina são muito pequenos e não atingem um tamanho comparável às demais substâncias após o congelamento das soluções. As ligações de hidrogênio que se estabelecem entre as moléculas d'água e as do soluto podem substituir facilmente as ligações de hidrogênio, quer entre as moléculas do soluto, quer entre as moléculas d'água. Mesmo após a fusão do gelo, os cristais de riboflavina são muito menores do que os cristais de gelo formados na solução (Figura 46).

Na presença de moléculas de riboflavina as moléculas d'água puderam ordenar-se na forma de grandes cristais de gelo hexagonal (Figura 45). Pode-se, no entanto, observar que a transparência dos cristais de gelo permite a visualização de bolhas (que apresentam-se grandes e escuras), mas não o contorno de cristais nas camadas inferiores. Sugere-se assim que estes cristais sofreram um desenvolvimento maior ao longo do seu eixo c, possivelmente por uma maior ocupação de espaço pela riboflavina no arranjo tridimensional da grade cristalina devido à hidrofobicidade de sua cadeia cíclica.

Na Figura 47 temos dois tipos de cristais de gelo decorrentes da presença do **ácido 4-aminobenzóico**, cristais hexagonais e filamentosos. Esta vitamina tem uma reduzida solubilidade em água (0,3 g/100gH<sub>2</sub>O) e sua natureza anfifílica tende a formar micelas. Moléculas com cadeias hidrofóbicas procuram formar um núcleo micelar esférico. Com isso, a interação água/grupo hidrofóbico

torna-se mínima, assim como as pontes de hidrogênio por unidade de volume (Luck, 1981).

Quando em baixas concentrações, formaram-se poucos núcleos, de onde irradiaram longos filamentos (Figura 47A) enquanto outras moléculas interagiram com a água, permitindo a formação de cristais hexagonais. Com o aumento da concentração deu-se um aumento na nucleação e os cristais micelares tornaram-se menores e mais numerosos, ocorrendo o mesmo com os cristais hexagonais (Figura 47B e C). Uma vez que a transferência de massa não atue com a mesma intensidade em todos os pontos da amostra, pode ocorrer uma distribuição irregular dos cristais, com zona de elevada densidade cristalina (alta nucleação) e outra, devido a poucos germes, cresce fina e com grandes cristais (Lerici e Pallota, 1972).

A diferença de efeitos destas duas vitaminas na estruturação dos cristais de gelo foi marcada pela solubilidade das mesmas. Ambas têm caráter anfifílico, porém, com diferentes graus de relação entre hidrofobicidade e hidrofília.

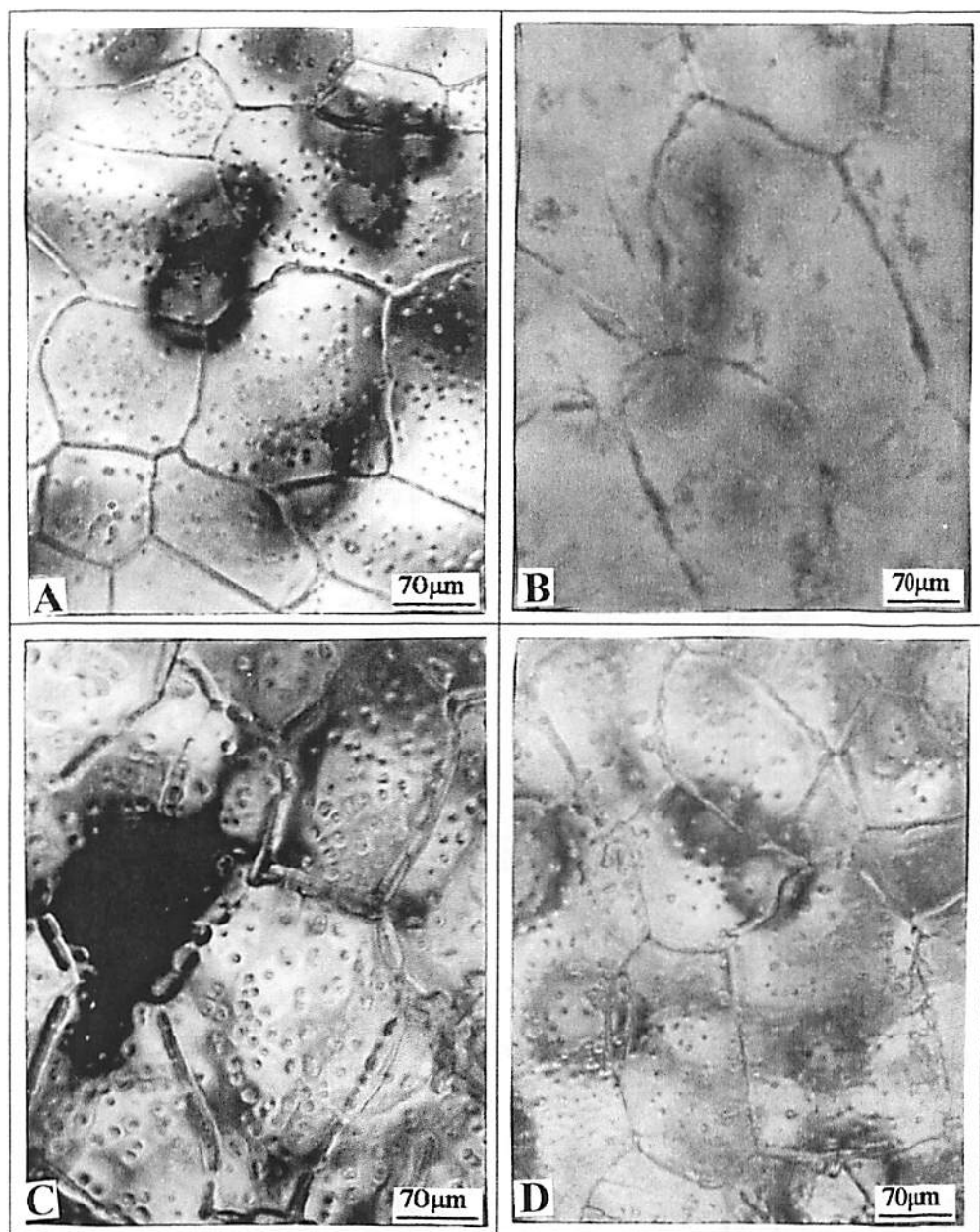


FIGURA 45 Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo **riboflavina** nas concentrações de A) 0,25%, B) 0,5%, C) 0,75% e D) 1%.

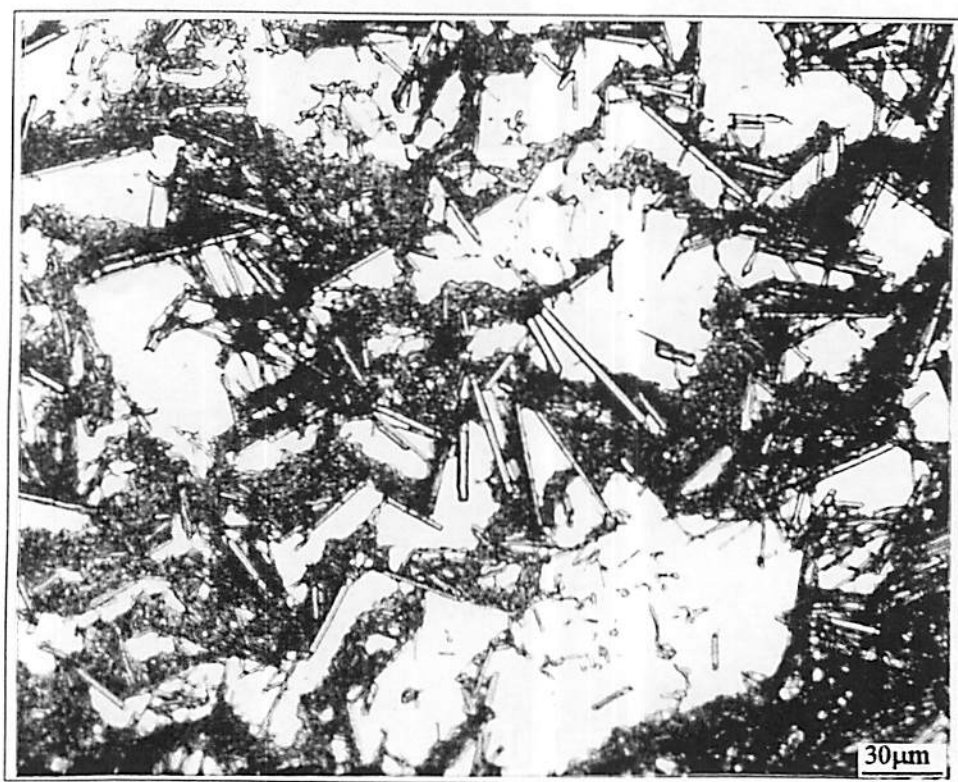


FIGURA 46 Cristais de riboflavina registrados após congelamento e evaporação da solução aquosa a 1%.



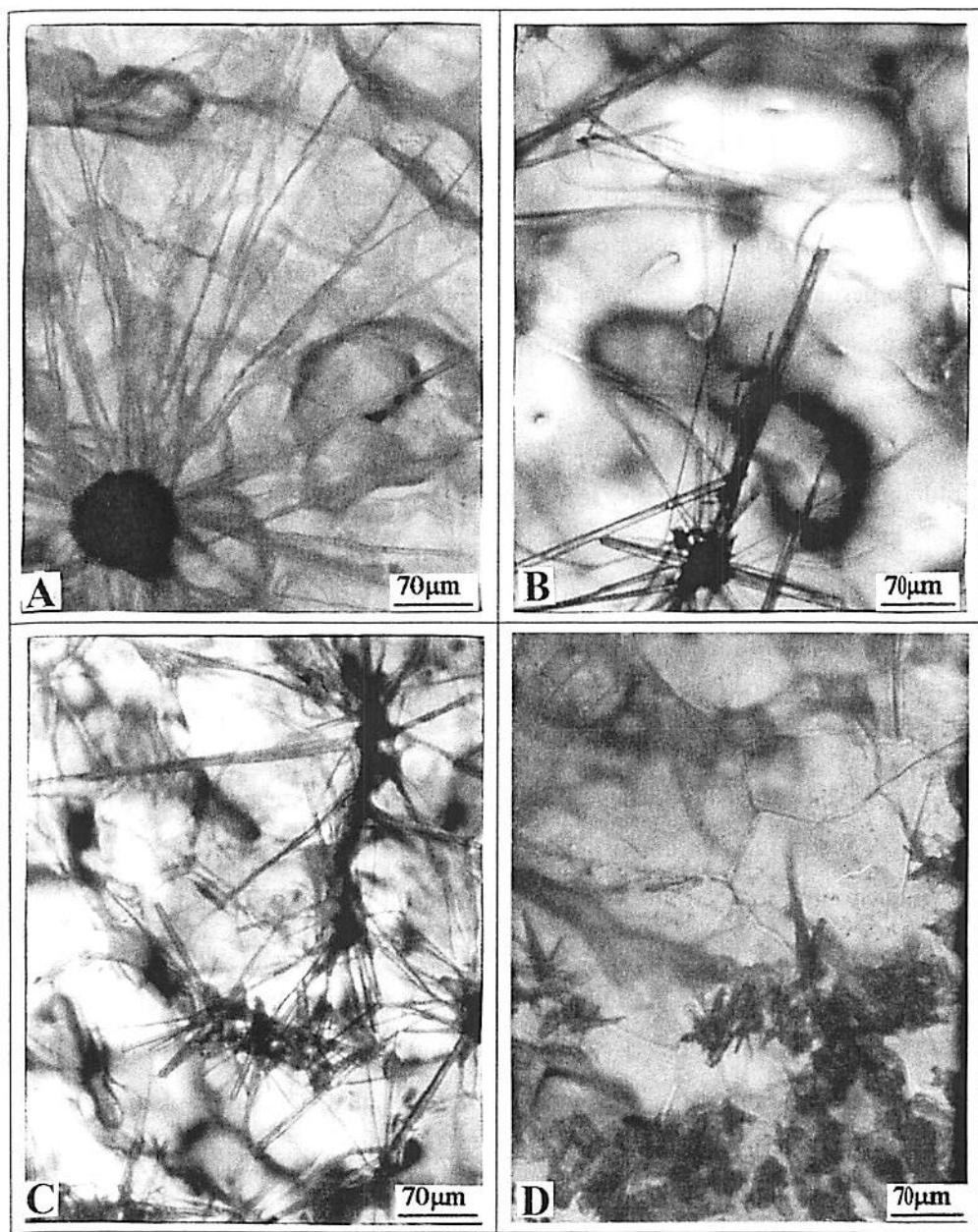


FIGURA 47 Cristais de gelo em soluções aquosas contendo **ácido 4-aminoben-zóico** nas concentrações de A) 0,5%, B) 0,75%, C) 1% e D) 3%.

#### 4.1.3 Estruturação do gelo sob a influência de aminoácidos

A Figura 48 representa a estruturação de cristais de gelo promovida por um pequeno aminoácido polar, a **glicina**. Os cristais de gelo estruturados pela glicina apresentaram um aspecto concêntrico em vários campos das amostras. Aumentando-se a concentração, os cristais tornaram-se mais alongados, no entanto, não perderam a característica de concentricidade. Os cristais mais regulares mostraram-se 'almofadados', enquanto os mais longos pareceram mais planos.

Outra característica destas soluções congeladas são finíssimos filamentos radiais, extremamente lábeis, formados sobre o centro dos cristais hexagonais. Na Figura 49 tem-se uma visão mais ampla destes cristais.

Um modelo foi proposto para explicar a grande distorção que ocorre nos cristais de gelo estruturados por moléculas de glicina (Figura 50). Sugere-se que os cristais tornam-se mais estreitos pela interação lateral entre os terminais das moléculas do aminoácido.

Na Figura 51 vê-se cristais de gelo formados em solução aquosa contendo **cisteína**. A cisteína tem como radical um grupo sulfidril ( $-SH$ ) que teria um caráter hidrofóbico mas é muito reativo, tendendo a ionizar-se facilmente, permitindo assim, a este aminoácido, um comportamento polar. No entanto, a cisteína tem baixa solubilidade em água e pode-se perceber um marcante efeito da concentração no tamanho dos cristais. Nas concentrações mais baixas (1% e 3%) os cristais apresentaram-se maiores, mais regulares, mais lisos e mais planos (Figuras 51A e B). Em concentrações maiores (5% e 7%), os cristais apresentaram-se menores, menos definidos e com depressões na superfície (Figuras 51C e D).

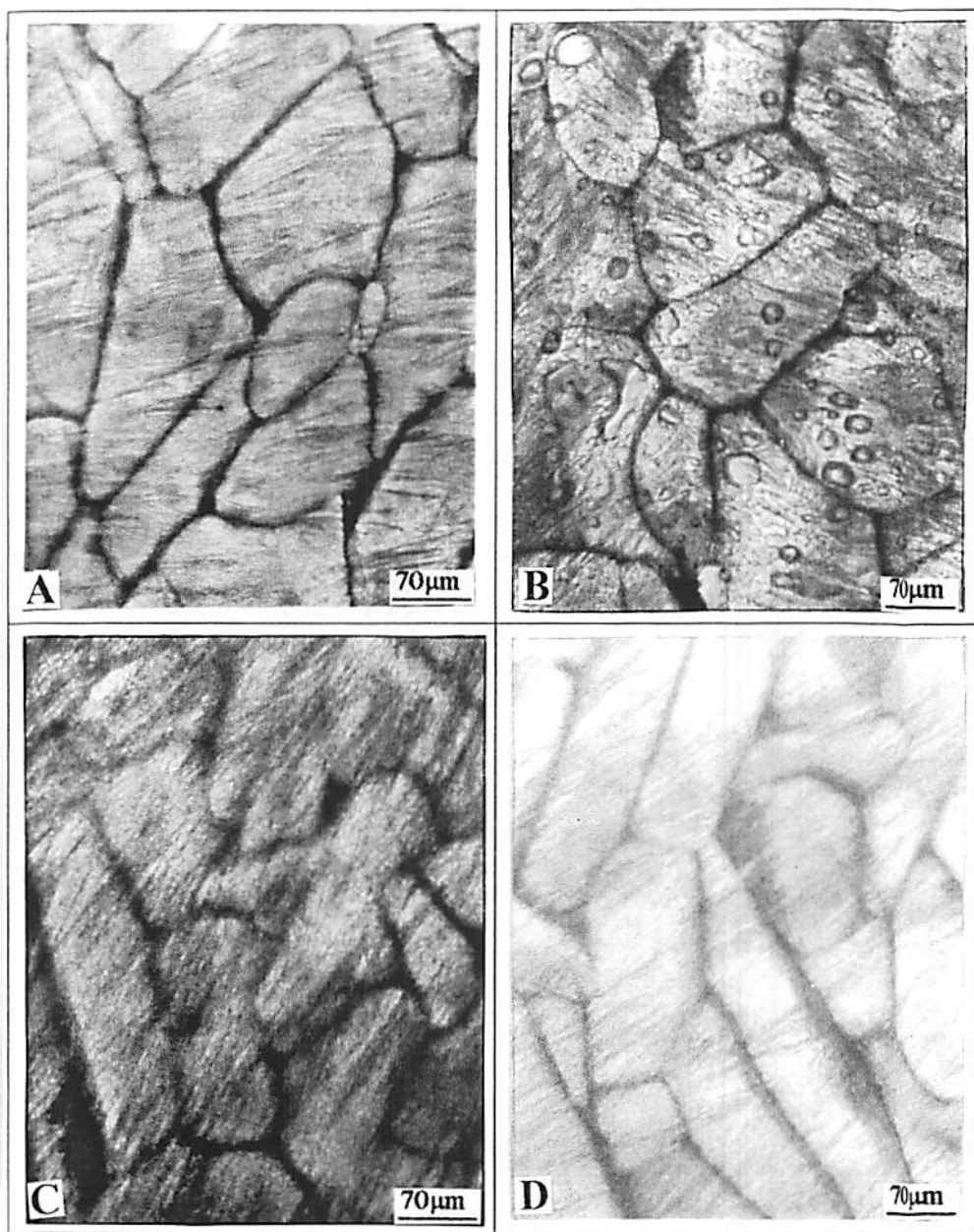


FIGURA 48 Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo glicina nas concentrações de A) 0,25%, B) 0,5%, C) 0,75% e D) 1%.

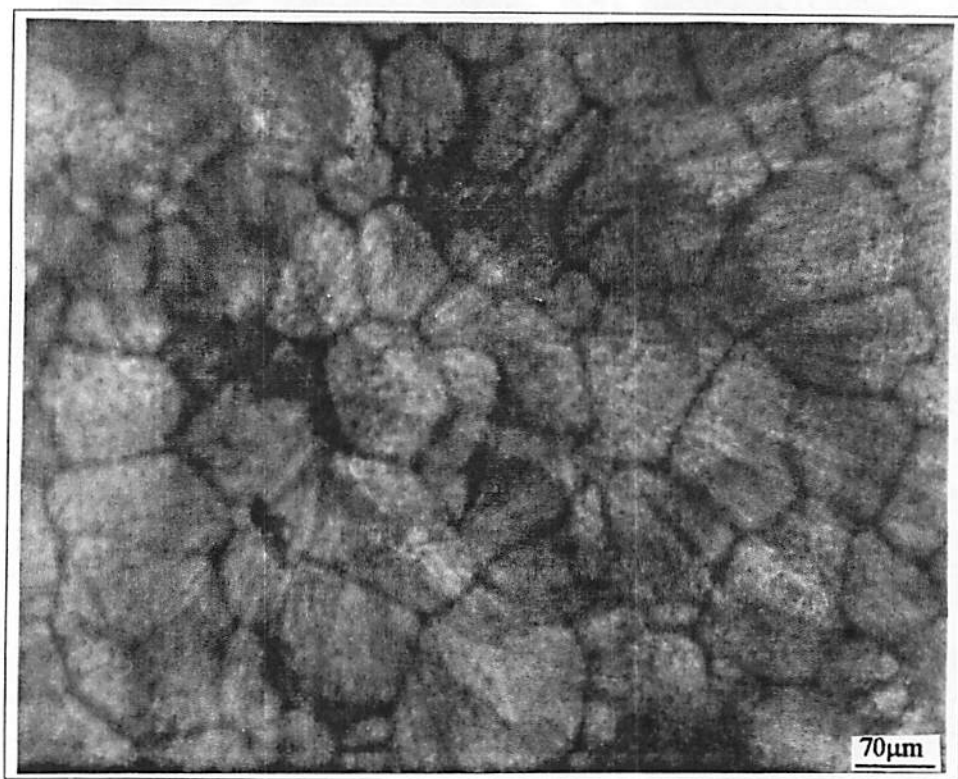
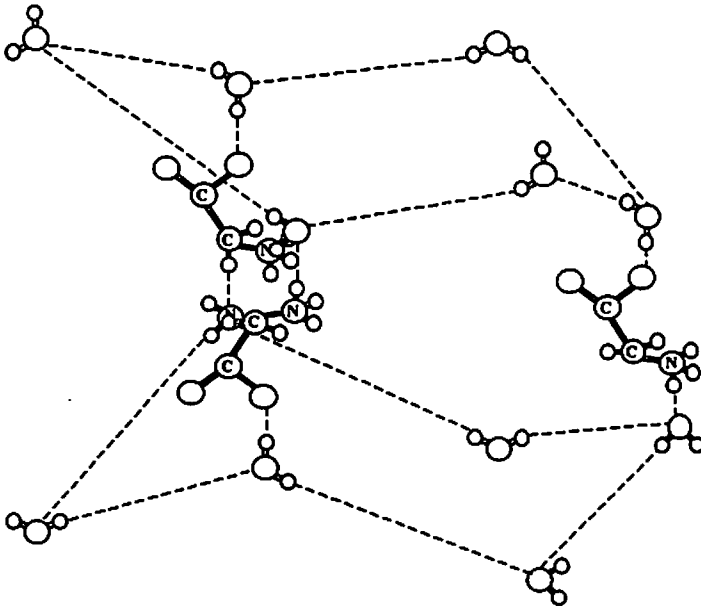


FIGURA 49 Estruturação de cristais de gelo em solução aquosa contendo glicina 0,5%. Os cristais desenvolveram-se em torno de um cristal hexagonal bem definido.



**FIGURA 50** Modelo proposto para explicar a interação da glicina na grade cristalina. Apesar das moléculas de glicina possivelmente ligarem-se entre as camadas d'água por suas extremidades, outras terminações estariam disponíveis a interagir com moléculas do mesmo soluto, forçando assim o estreitamento dos cristais de gelo.

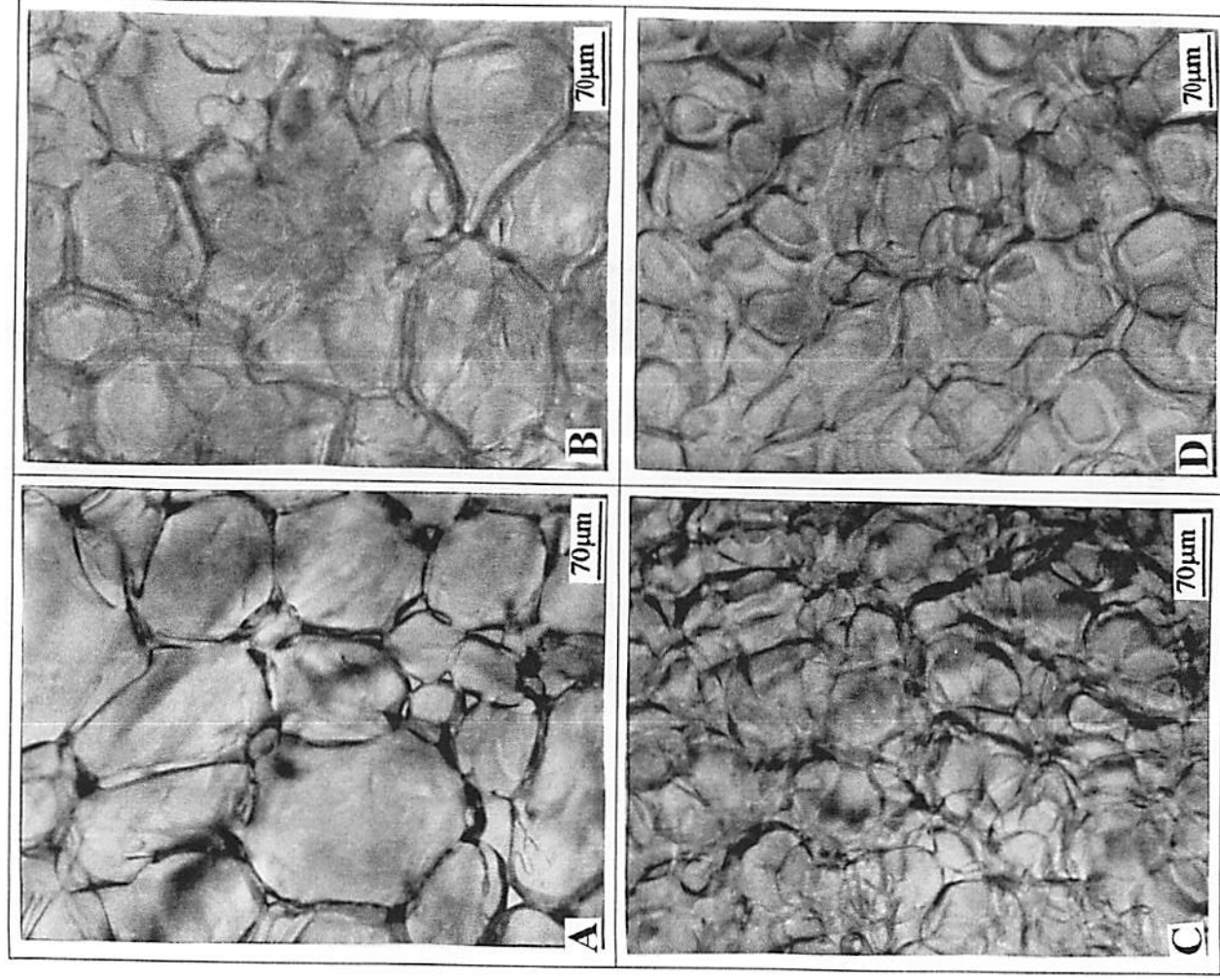


FIGURA 51 Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo cis-teína nas concentrações de A) 1%, B) 3%, C) 5% e D) 7%.

Na Figura 52 temos cristais de gelo estruturados pelo ácido aspártico. Este aminoácido exerce o poder de alinhar suas moléculas e as moléculas d'água em longos feixes por toda a extensão da amostra ao longo do plano basal.

Pode-se também observar um efeito da concentração. Sob concentrações mais baixas (0,5% e 1%) foram formados cristais alongados que se cruzaram de uma maneira caótica (Figuras 52A e B). À medida que se aumentou a concentração, a orientação destes cristais tornou-se melhor definida a ponto de formarem-se longos fechos paralelos (Figuras 52C e D) que cruzaram-se perpendicularmente (Figura 53). Cristais individuais de ácido aspártico que se formaram decorrentes do congelamento, apresentaram-se menores a concentrações maiores devido a uma maior nucleação (Figura 54).

A interação do ácido glutâmico com a água no congelamento algumas vezes tendeu a comparar-se com a do ácido aspártico (Figura 55A e B), mas suas moléculas provocaram, caracteristicamente, outra estruturação. Foram formados cristais menores e do tipo hexagonal. Assim como no caso da glicina, os cristais de gelo procuraram circundar determinadas regiões e ocorreu também a formação de finíssimas agulhas irradiando na superfície coincidindo com estes núcleos. Os cristais apresentaram-se planos e com superfície lisa. O tamanho dos cristais não foi significativamente afetado pela concentração empregada.

A Figura 56 apresenta uma visão mais ampla da estruturação concêntrica dos cristais de gelo provocada pelo ácido glutâmico.

Estes dois aminoácidos são geralmente chamados de aspartato e glutamato para salientar que suas cadeias laterais têm, quase sempre, cargas negativas em pH fisiológico. Eles contêm um segundo grupo carboxílico ( $-\text{COOH}$ ) e são designados ácidos. Embora com características químicas muito semelhantes, seus comportamentos frente à cristalização em soluções aquosas apresentaram-se muito diversos, o que sugere estudos mais aprofundados da estruturação de cristais de gelo por substâncias dentro de uma mesma classificação química.



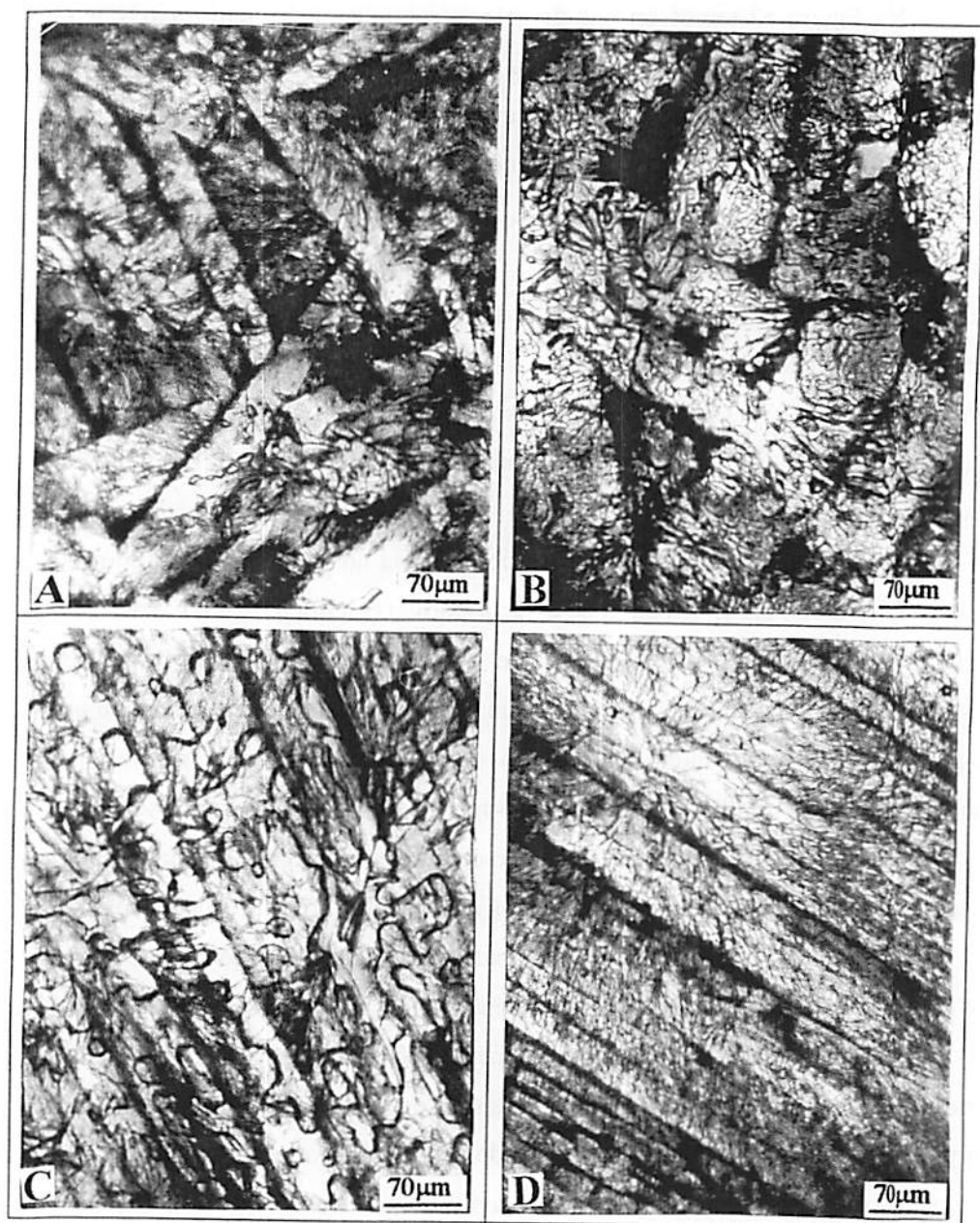


FIGURA 52 Cristais de gelo em soluções aquosas contendo ácido aspártico nas concentrações de A) 0,25%, B) 0,75%, C) 1,5% e D) 3%.



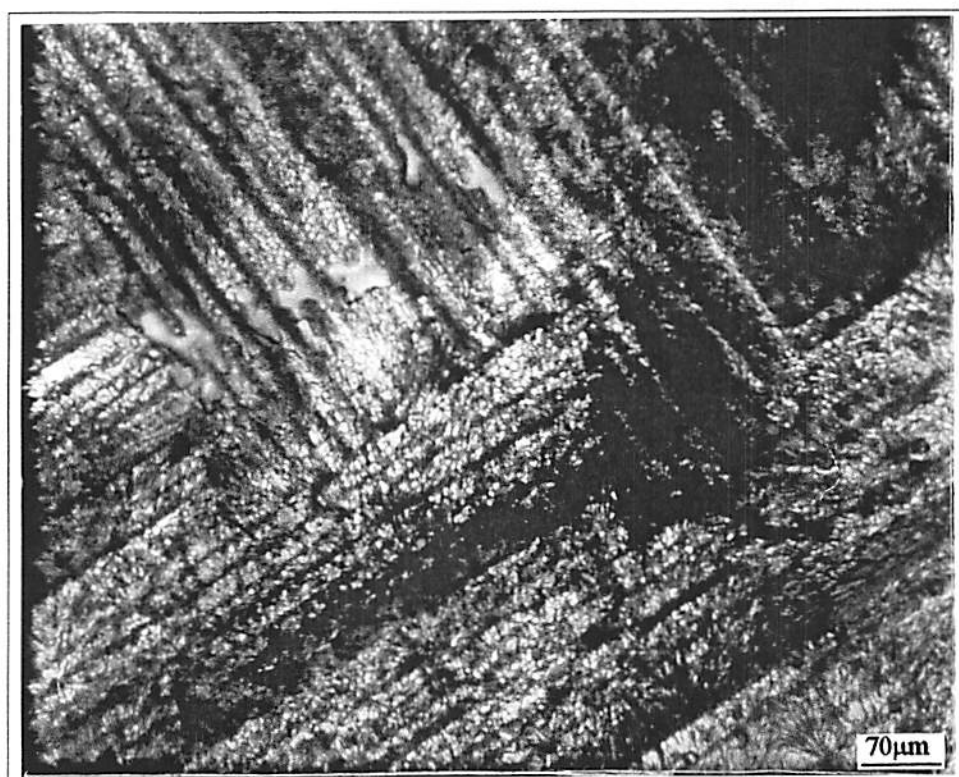


FIGURA 53 Estruturação de cristais de gelo em solução aquosa contendo ácido aspártico (5%). Longos feixes paralelos cruzam-se perpendicularmente.

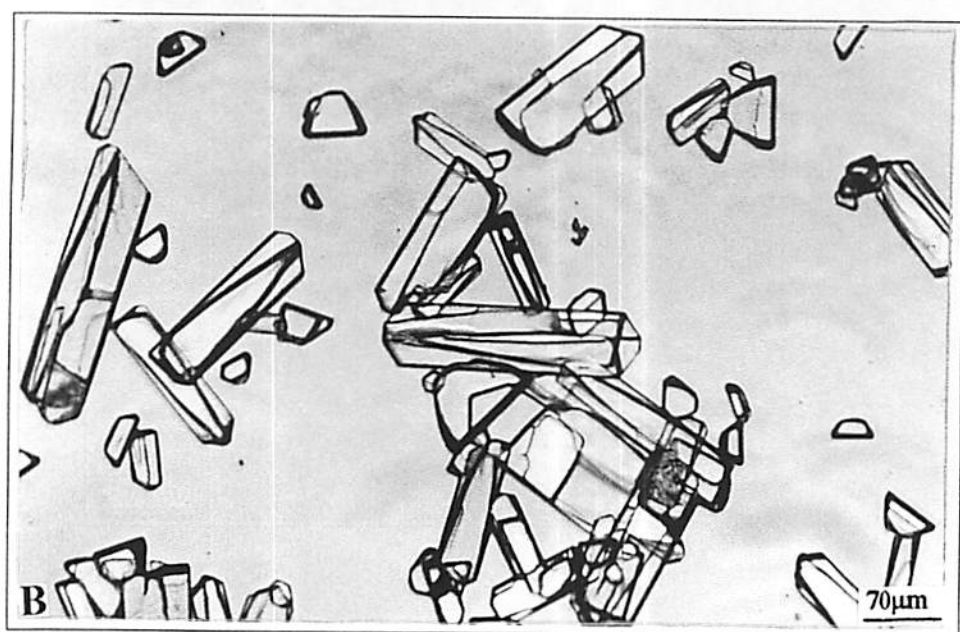
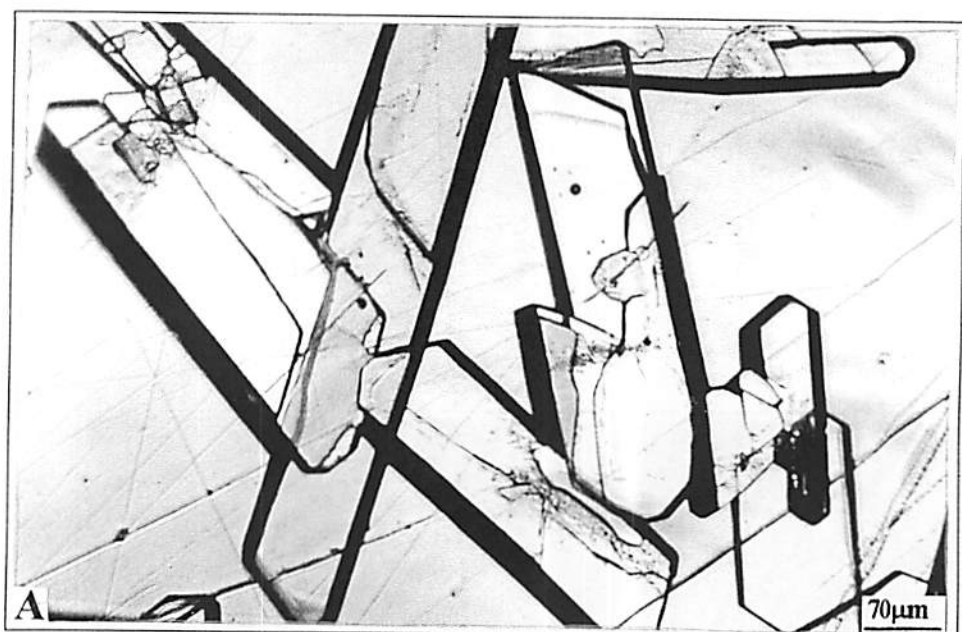


FIGURA 54 Cristais de ácido aspártico registrados após congelamento e evaporação de soluções aquosas nas concentrações iniciais de 1% (A) e 3% (B).

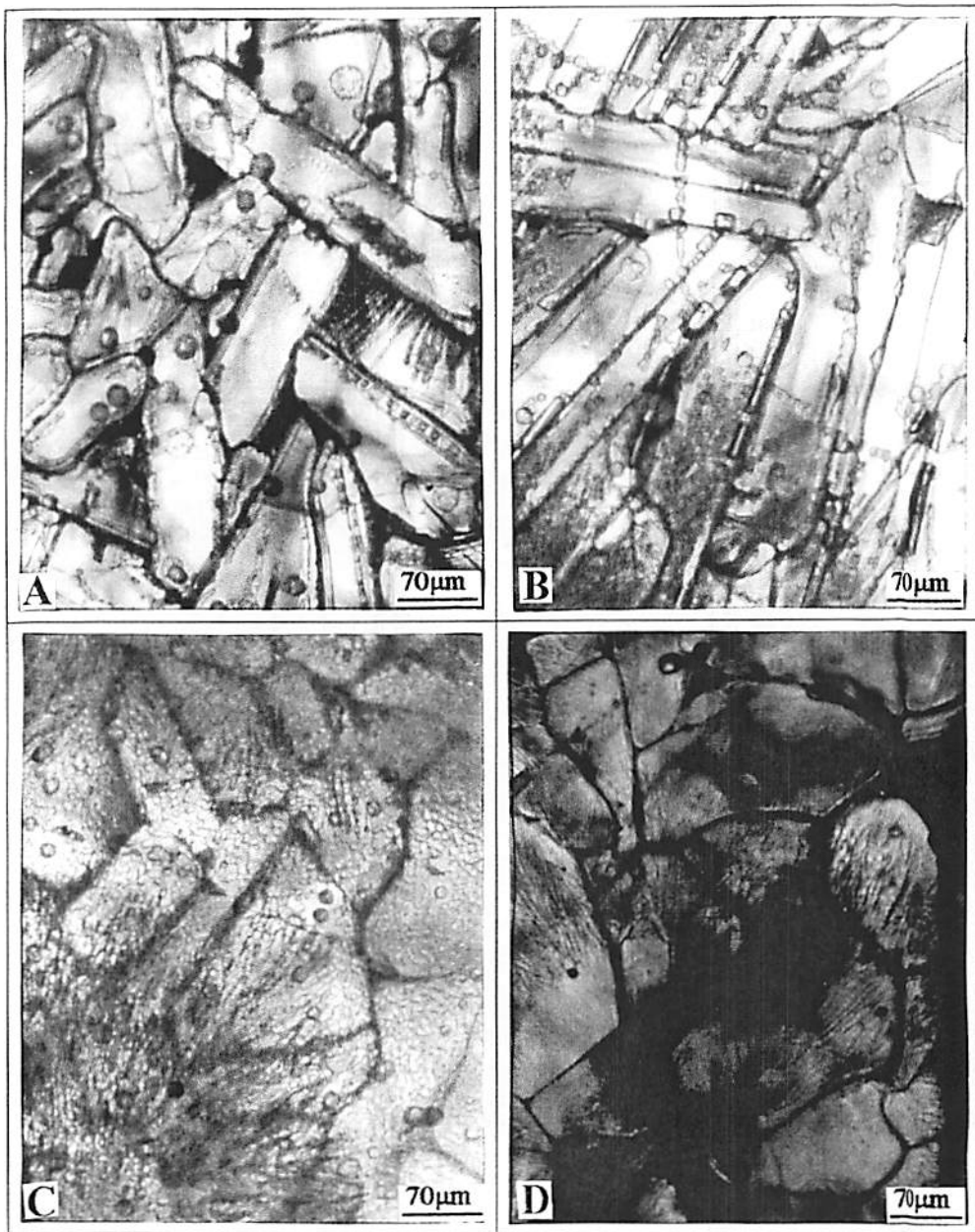


FIGURA 55 Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo ácido glutâmico aos níveis de A) 1%, B) 3%, C) 5% e D) 7%.

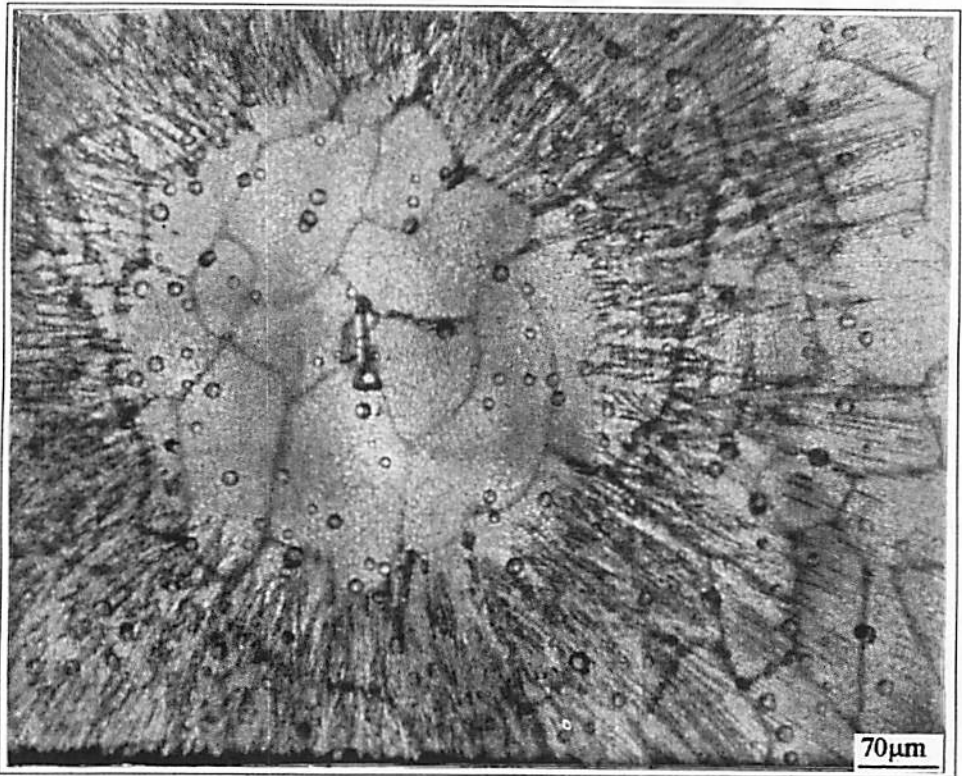


FIGURA 56 Estruturação de cristais de gelo em solução aquosa contendo ácido glutâmico (3%). Os cristais hexagonais partem concentricamente de um ponto sobre o qual radiam finíssimas e lábeis agulhas de gelo.

Na Figura 57 têm-se cristais de gelo estruturados pela presença de prolina em solução aquosa. Pode-se verificar um comportamento muito semelhante ao promovido pela presença de cisteína. A concentração também teve efeito marcante sobre o tamanho e disposição dos cristais de gelo. Sob baixa concentração (1%), vêem-se cristais hexagonais de contorno bem definido, planos e de superfície lisa (Figura 57A). A uma concentração maior (3%), os cristais de gelo apresentaram-se amontoados, com maior deformação da estrutura hexagonal e pareceram apresentar menor crescimento ao longo do eixo c, por deixar transparecer camadas inferiores (Figura 57B). Com maior aumento da concentração, os cristais de gelo apresentaram tamanho bastante reduzido e formato arredondado (Figuras 57C e D). Estes cristais apresentaram-se com altura também reduzida mostrando a sobreposição dos mesmos. No entanto, as superfícies mantiveram-se lisas. A prolina é frequentemente encontrada em plantas aclimatadas (Koster e Lynch, 1992), possivelmente porque o seu acúmulo em concentrações elevadas pode reduzir consideravelmente o tamanho dos cristais de gelo.

Na Figura 58 vêem-se cristais de gelo estruturados pela presença de metionina. Este aminoácido hidrofóbico e de baixa solubilidade em água (3,38 g/100gH<sub>2</sub>O) promoveu a formação de cristais longos e largos que se entrecruzaram caoticamente. A metionina, que em sua forma pura apresenta-se na forma de pequenos cristais, algumas vezes sem formato definido, (Figura 37j), tem a propriedade de unir-se em solução aquosa, formando grandes agulhas decorrentes do congelamento (Figura 59).

Apesar da cadeia lateral da prolina ser muito mais hidrofóbica do que a da metionina, a sua solubilidade é muito superior (16,23 g/100gH<sub>2</sub>O). Isto faz com que as moléculas d'água e de prolina possam difundir no meio para formarem cristais de gelo hexagonais ou arredondados, enquanto que as moléculas de metionina procuram interagir umas com as outras, influenciando a cristalização da água, segundo o padrão de cristalização do soluto.

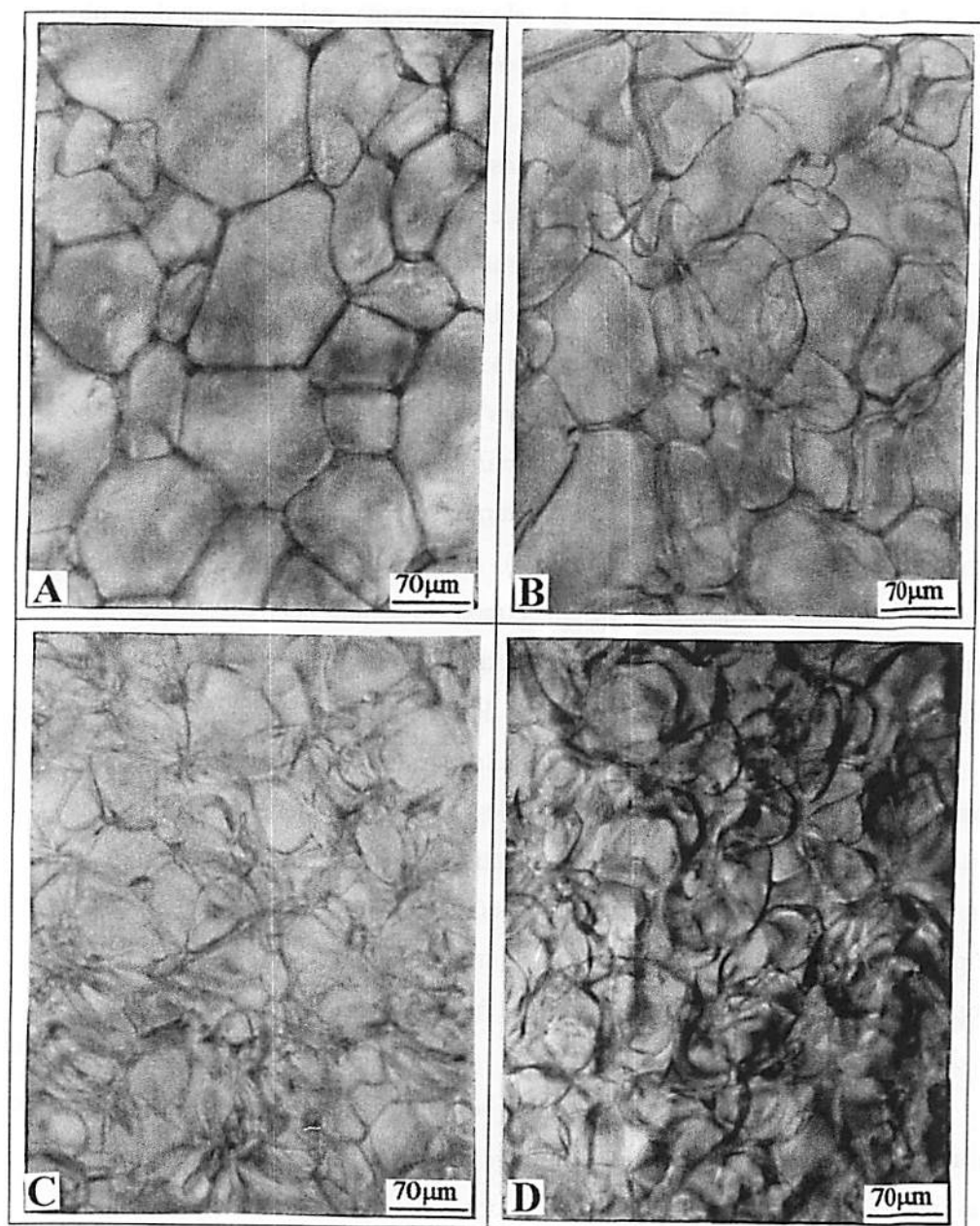


FIGURA 57 Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo **prolina** nas concentrações de A) 1%, B) 3%, C) 5% e D) 7%.



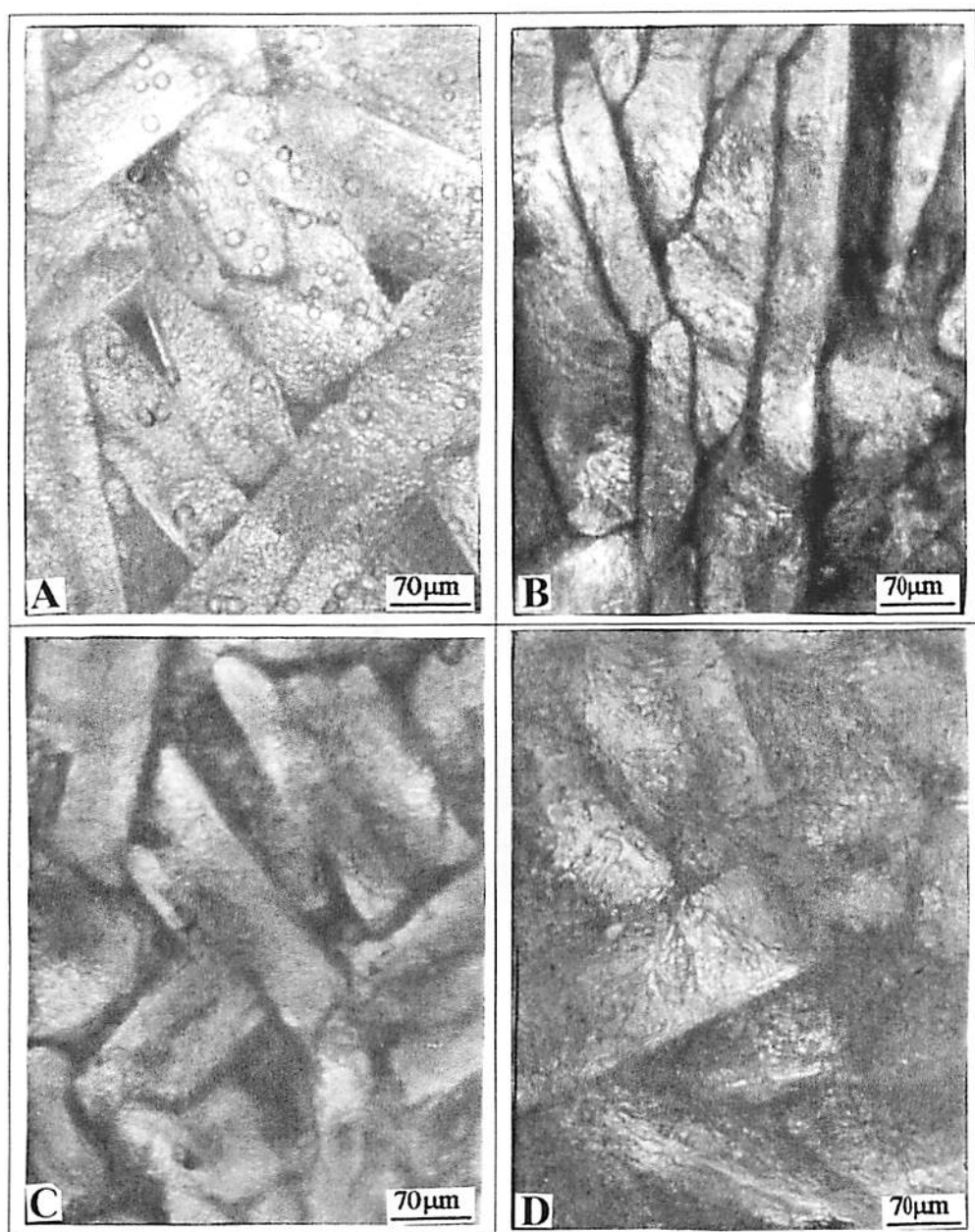


FIGURA 58 Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo metionina nas concentrações de A) 0,25%, B) 0,5%, C) 0,75% e D) 1%.

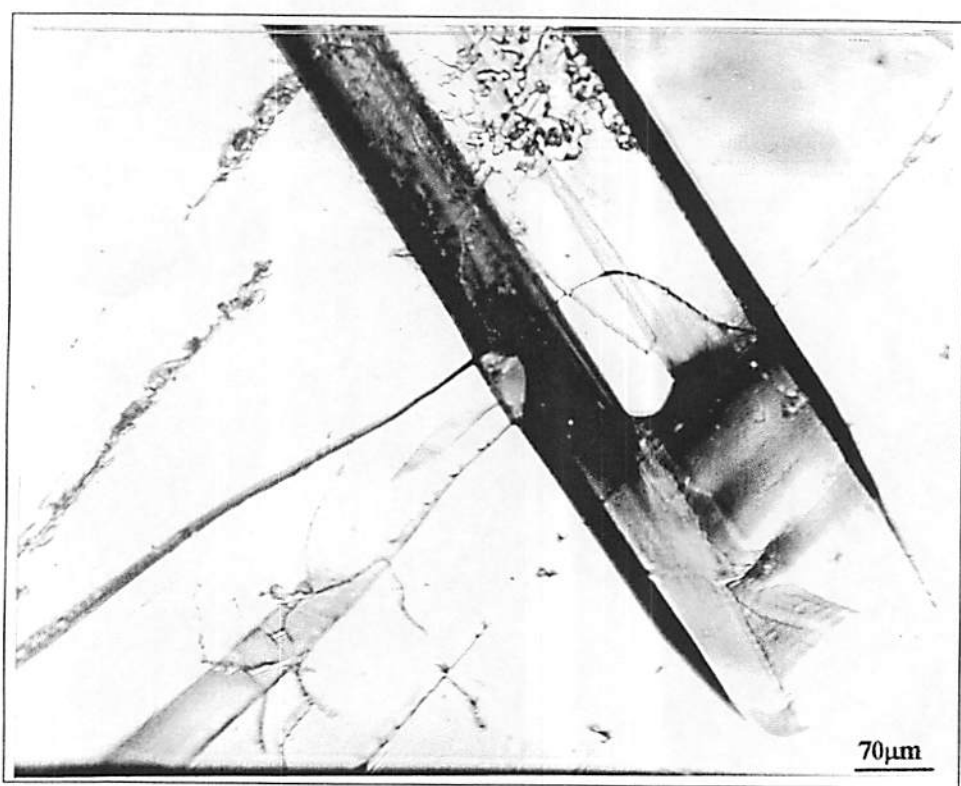


FIGURA 59 Cristais de metionina registrados após congelamento e evaporação da solução aquosa (7%).



## 4.2 Danos em tecidos vegetais

Tecidos de frutos (mamão e caqui) foram observados em face do congelamento lento, procurando-se identificar a influência da estruturação de cristais de gelo promovida pela infusão de determinadas substâncias. Embora o conteúdo d'água em mamão seja da ordem de 90,8% e em caqui cerca de 78,2% (Hayes, 1987) e sendo as células deste último maiores do que as de mamão, os resultados encontrados para ambos foi muito semelhante. Isto demonstra que pequenas diferenças entre frutos não são muito significativas frente a danos por congelamento. O mesocarpo destes frutos consiste de células arredondadas com finas paredes, tubos latex e feixes fibro-vasculares.

Tecidos não congelados, embebidos em parafina e seccionados em micrótomo apresentaram células com paredes celulares em sua grande maioria, intactas (Figura 60).

Dano comum causado por cristais de gelo, principalmente pelos mais protudentes, é a perfuração das paredes celulares como pode-se ver claramente na Figura 61. Os cristais muitas vezes atravessam células de um lado a outro, principalmente quando apresentam-se em forma de agulhas, morfologia típica de cristais de gelo em soluções aquosas contendo açúcares. Segundo Luyet (1968), os cristais de gelo encontrados no congelamento de tecidos são normalmente dendritos irregulares. Isto porque a quantidade de material exposto ao congelamento é normalmente muito grande para permitir um congelamento suficientemente rápido, levando a estruturas hexagonais regulares, as quais seriam geralmente inibidas também pela configuração dos tecidos.

O congelamento de blocos de tecido vegetal normalmente se dá em duas etapas: primeiro o gelo se forma sobre a superfície do bloco, então penetra nos interstícios entre as células e, finalmente, pode entrar nas células. As membranas são o principal obstáculo à passagem do gelo, mas podem finalmente serem penetradas.

A expansão de volume pela cristalização da água na região da lamela média, que é uma camada amorfa composta principalmente de pectina, provoca um estresse compressivo sobre cada parede separando as células, como vê-se na Figura 62. O gelo segue o caminho de menor resistência, no caso a lamela média, formando uma lâmina que força a compactação e ruptura dos tecidos. A extensão do dano irá depender das propriedades mecânicas da matriz circundante (Levitt, 1980).

A formação do gelo extracelular pode causar dois tipos de desidratação: periperal e citorrese. No primeiro caso a água deixa o interior da célula e paredes verticais, liberando pequenas bolhas. O protoplasma desidratado contrai ao redor do núcleo no meio da célula e permanece conectado com as paredes por fino fio protoplasmático. A citorrese segue uma rápida desidratação via horizontal. Paredes celulares colapsam empurrando o conteúdo celular, cloroplastos e vacúolos, em direção às paredes internas, formando um anel (Modlibowska, 1968). Bulbos como a cebola apresentaram o colapso de suas paredes celulares, embora não tenham sido observadas células despreendidas (Figura 63). O gelo é propagado de célula a célula ao longo dos plasmodesmas. Supõe-se que as separações registradas nas paredes e membranas celulares de cebola (Figura 63B) sejam indicações da penetração de cristais de gelo, provocando também danos intracelulares.

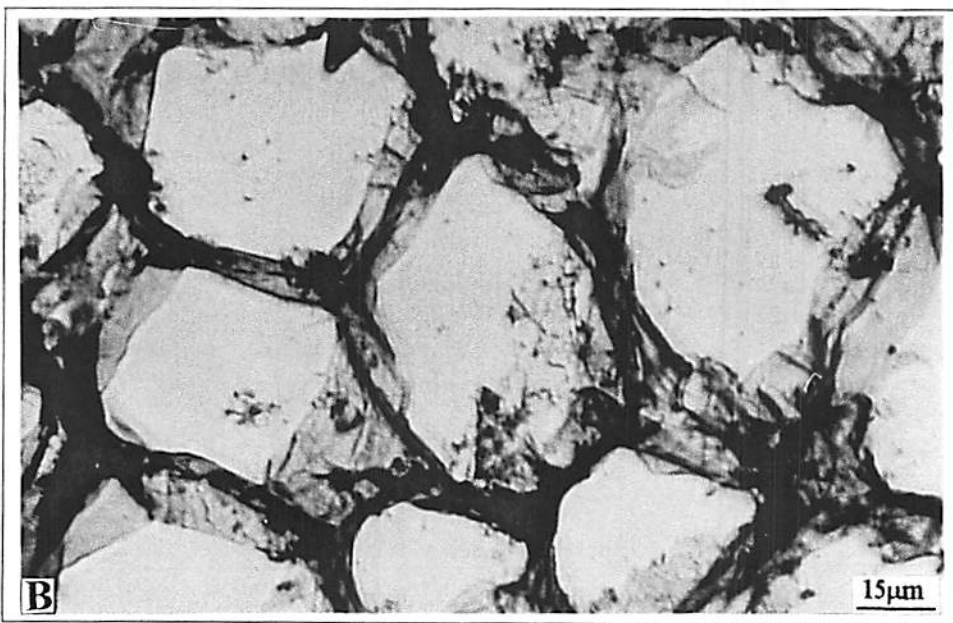
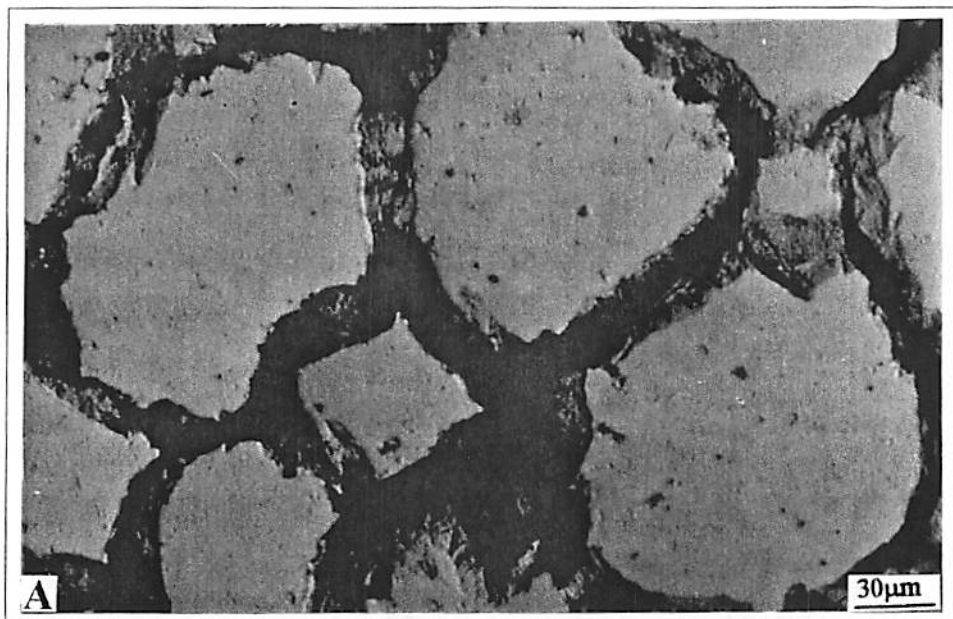


FIGURA 60 Células parenquimáticas de frutos não congelados, embebidos em parafina e corados com safranina. A) caqui e B) mamão.

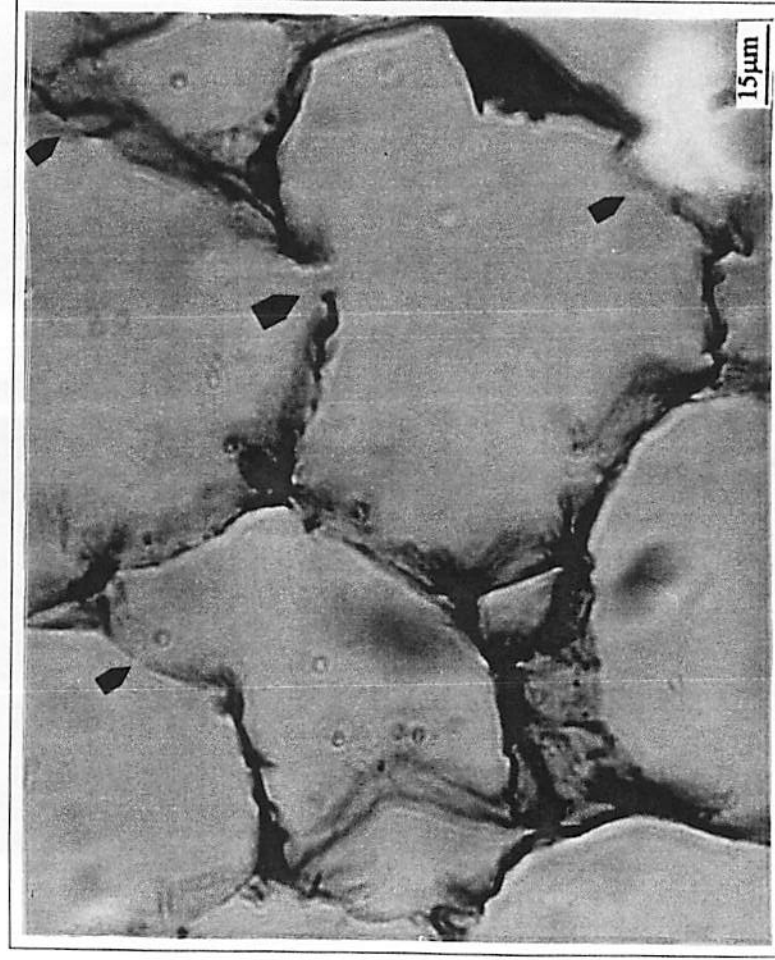


FIGURA 61 Exemplo de dano celular mostrando células parenquimáticas de mesocarpo de caqui perfuradas pela ação de cristais de gelo (▶ perfuração).

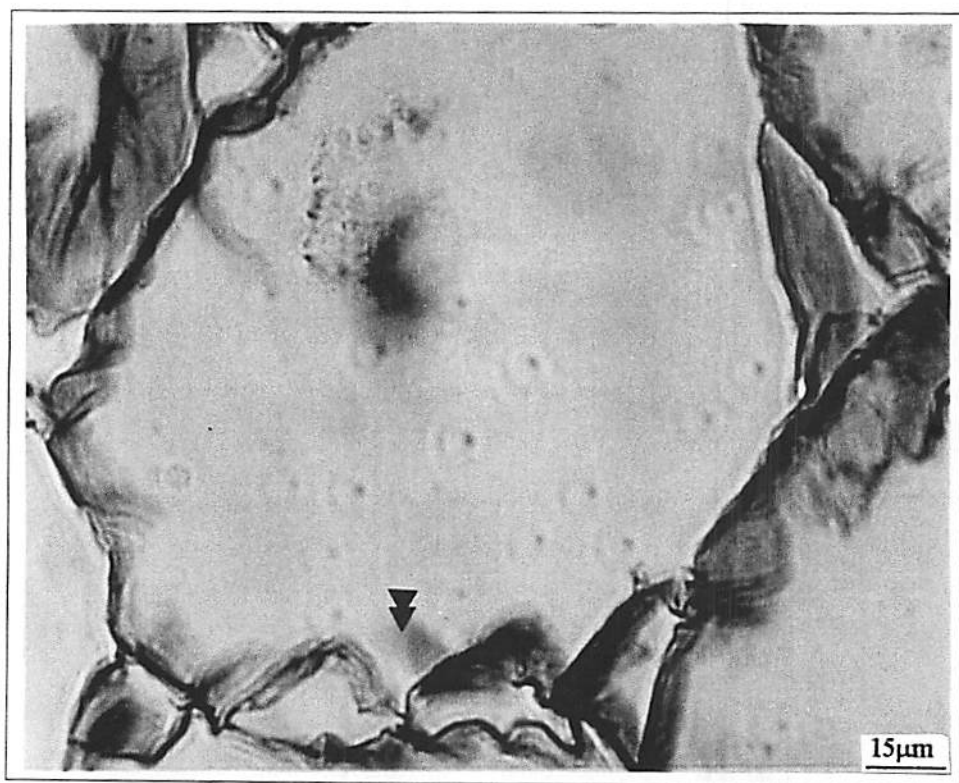


FIGURA 62 Exemplo de dano celular mostrando a separação de células a partir da lamela média por ação mecânica de cristais de gelo (▶ segregação).

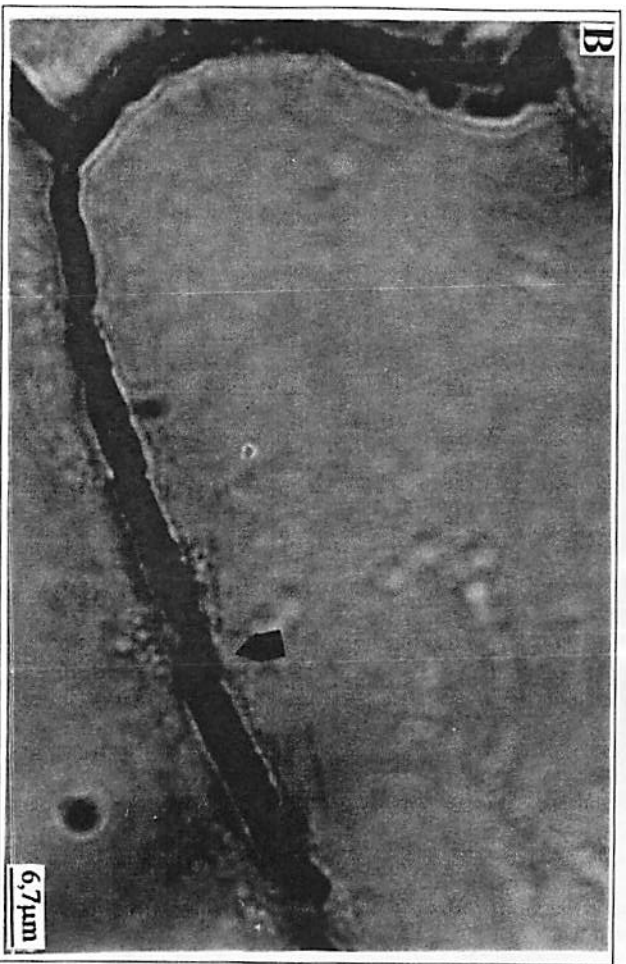
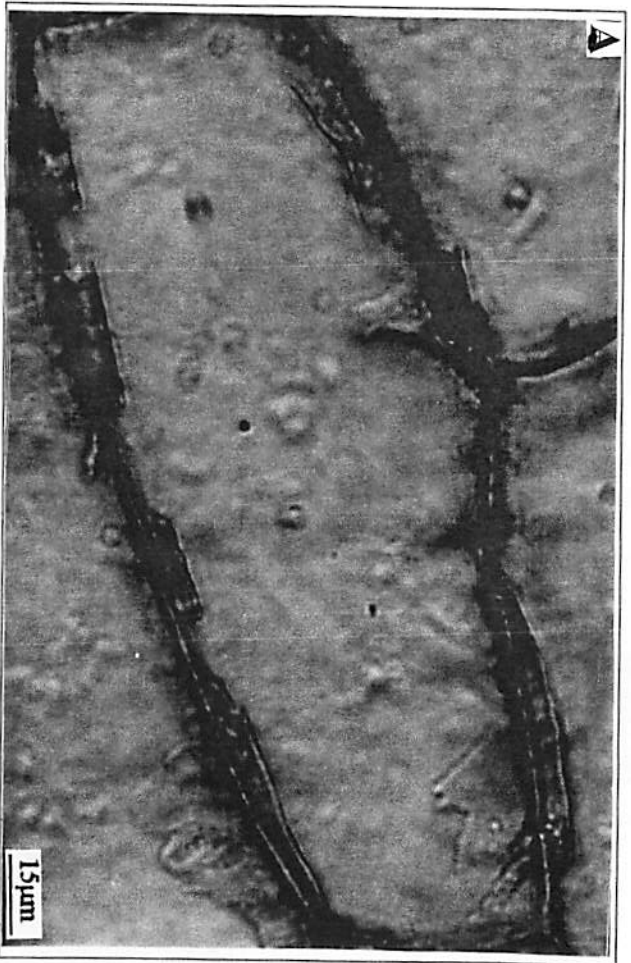


FIGURA 63 Células epidérmicas de cebola danificadas pela ação mecânica de cristais de gelo (▶perfuração).

Na Figura 64 temos frutos congelados sem a adição de qualquer substância. O principal dano ao tecido se deu pela separação das células, partindo da lamela média. As paredes celulares permaneceram, em sua grande maioria, intactas. Provavelmente foram formados grandes cristais hexagonais que não penetraram as células e, devido à região em que se formaram, puderam desagregar as células sem, contudo, rompê-las. Ainda pode-se perceber que algumas células sofreram desidratação, enquanto outras mantiveram o seu turgor.

Substâncias hipertônicas às células penetram as paredes celulares por difusão e ocupam um volume entre a parede celular e a plasmalema (Mujumdar, 1995). A impregnação de soluto também contribui para a crioestabilização devido à redução do conteúdo de água congelável (Martínez-Monzó et al., 1998).

Frutos que sofreram infusão em solução de frutose 20% anteriormente ao seu congelamento apresentaram grande enrugamento celular e células rompidas ao longo de sua extensão (Figura 65), o que contraria a afirmação de que os carboidratos protegem as membranas de danos por desidratação mantendo a sua integridade e função (Bendas et al., 1996). Isto somente deve acontecer quando a concentração do açúcar é muito alta e a solução no citoplasma tende a vitrificar ou pela redução da temperatura na qual este congela (Ilker e Szczesniak, 1990). No entanto, com uma concentração de equilíbrio em torno dos 15%, a água ainda possui mobilidade bastante para migrar e se alinhar em longos ramos dendríticos.

Os frutos que sofreram infusão em soluções de riboflavina 20% apresentaram menos segregação celular, no entanto, muitas células com paredes rompidas (Figura 66). Talvez sua afinidade por componentes hidrofílicos das membranas tenha exposto sua cadeia hidrofóbica com a formação de pequenos cristais de gelo esféricos e filamentosos. Cristais de riboflavina tenderam a impregnar as paredes celulares mais externas dos cubos de frutos congelados (Figura 67).

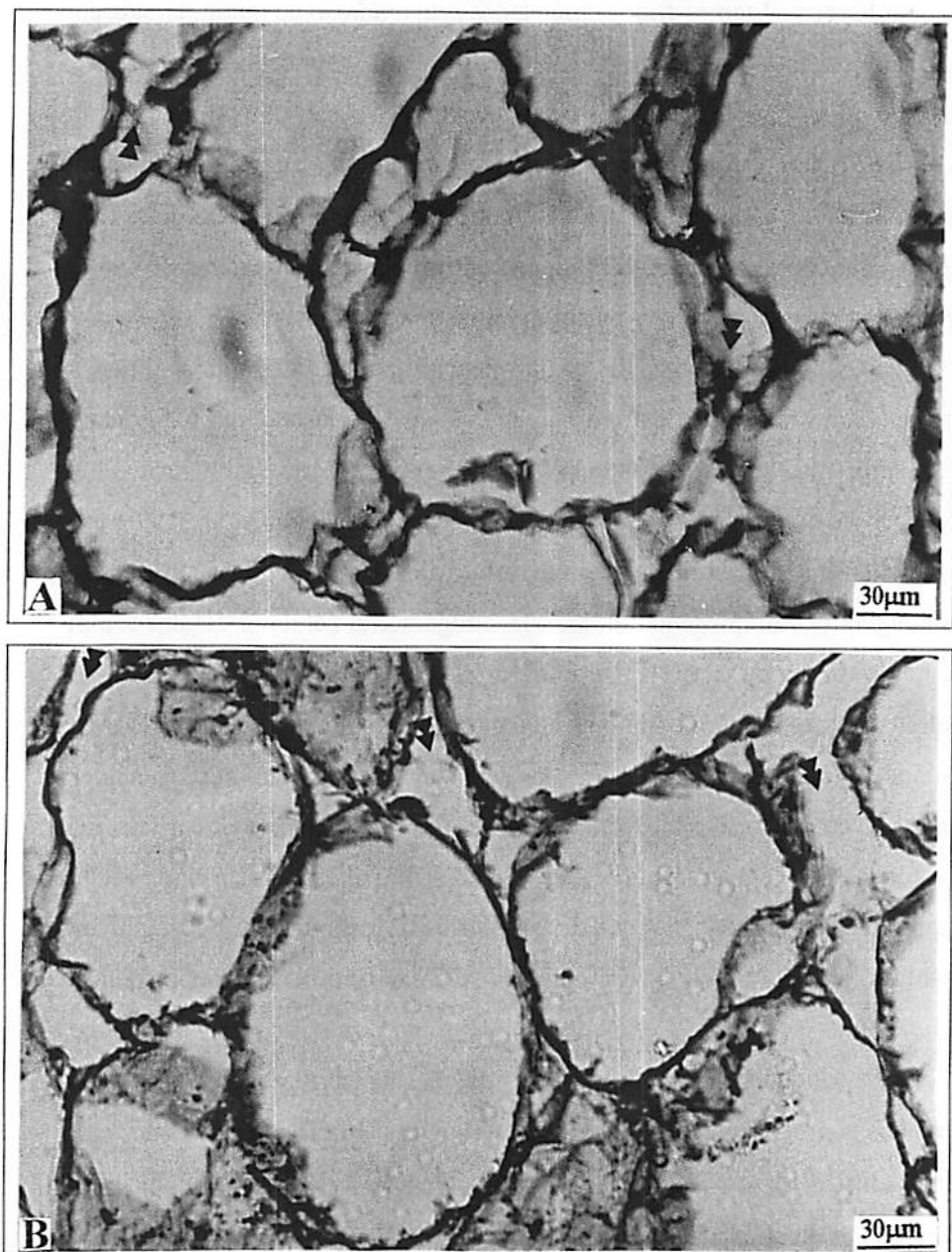


FIGURA 64 Células parenquimáticas do mesocarpo de frutos congelados, embebidos em parafina e corados com azul de toluidina, mostrando segregação celular. A) caqui e B) mamão. (►perfuração, ▶segregação).



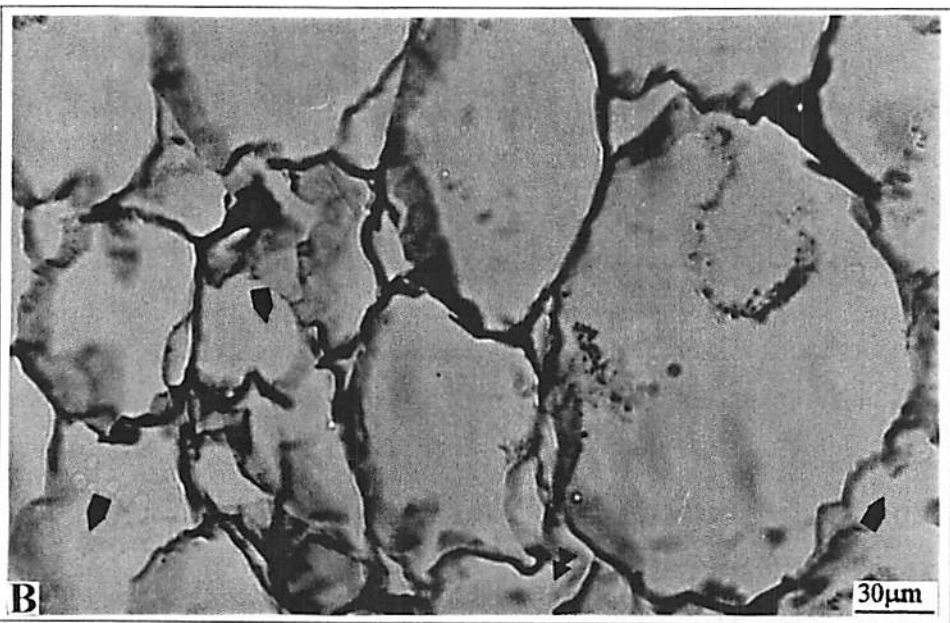
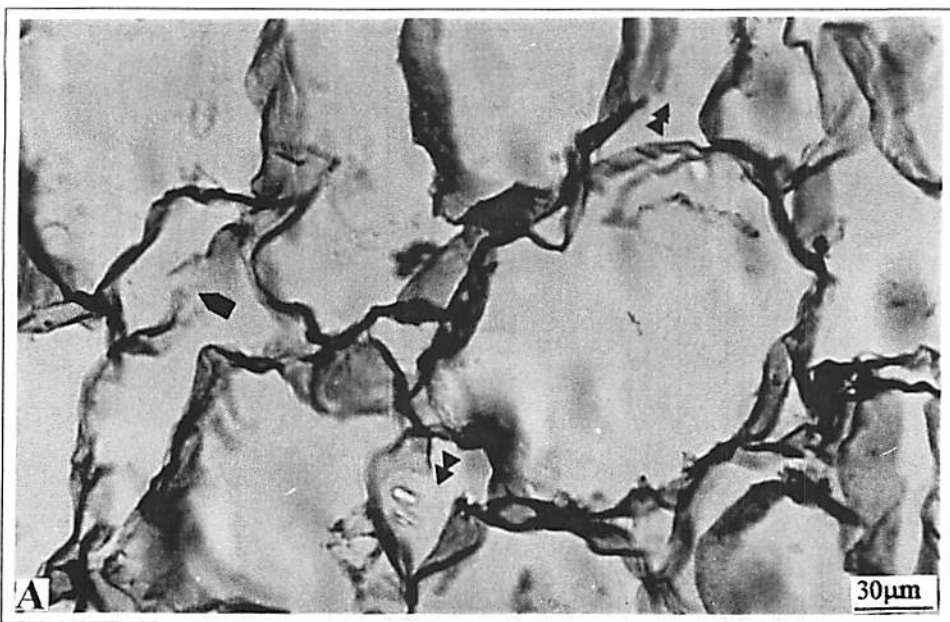


FIGURA 65 Tecido parenquimático de frutos congelados após infusão com frutose 20%, apresentando severa desidratação e perfurações de paredes celulares. A) caqui e B) mamão. (▶perfuração, ▶segregação).

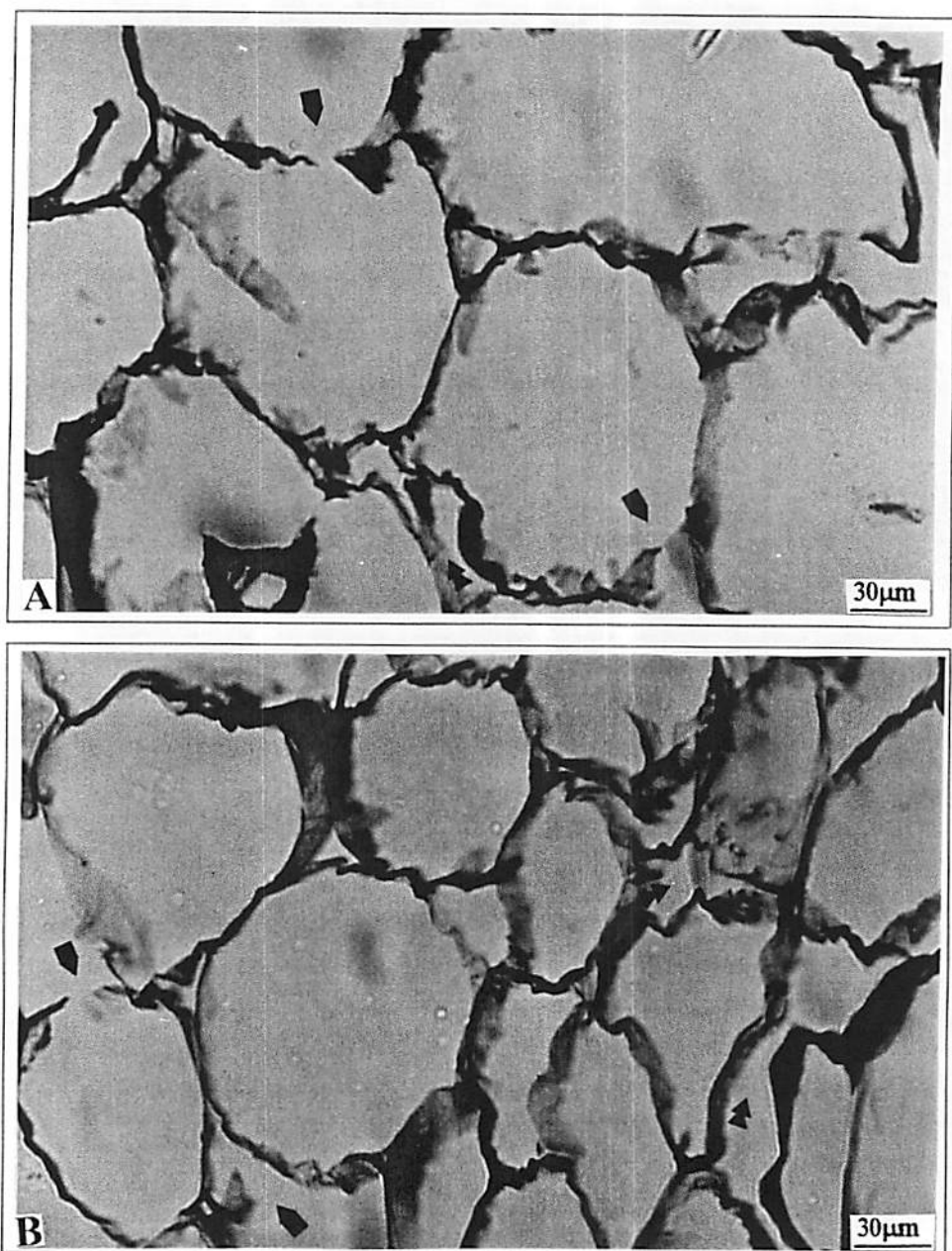


FIGURA 66 Células parenquimáticas de mesocarpo de frutos congelados após infusão com riboflavina 20%, apresentando algumas perfurações e segregação celular. A) caqui e B) mamão. (▶perfuração, ▶segregação).

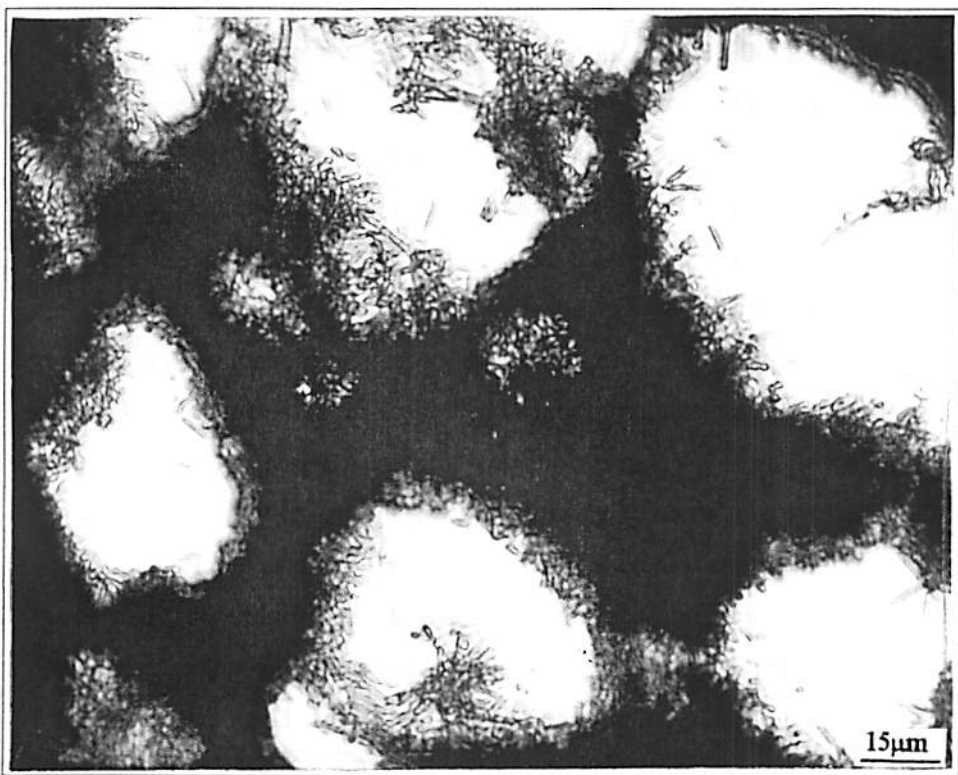


FIGURA 67 Células parenquimáticas de mesocarpo de caqui congelado e embocado em parafina apresentando impregnação com riboflavina.

Frutos congelados após infusão com glicina 20% (Figura 68) apresentaram enrugamento, segregação e perfuração das paredes iniciando a partir dos espaços intercelulares. A glicina é capaz de promover a formação de grandes cristais de gelo, os quais, à medida que aumenta a proporção de soluto, tornam-se mais estreitos e compridos. No caso do mamão, que contém mais água, os cristais de gelo devem ter se estruturado de forma mais hexagonal, forçando as paredes e separando as células; enquanto no caqui, cujo conteúdo d'água é menor, os cristais de gelo mais afinados romperam as paredes como facas afiadas.

Estruturas subcelulares como vacúolos e vesículas podem contrair em decorrência da desidratação causada pelo crescimento de cristais extracelulares como aconteceu no caso do congelamento de tecido após a infusão com glicina (Figura 69b e c) mais do que no congelamento sem a infusão de substâncias (Figura 69a). As organelas tornam-se distorcidas quando a desidratação é severa e a parede celular desenvolve pregas e deforma a plasmalema adjacente (DeMan et al., 1979; Kramer e Boyer, 1995).

Frutos congelados que sofreram imersão em solução aquosa contendo lisina 20% (Figura 70) apresentaram pouca segregação celular, algumas perfurações e, em poucos casos, o colapso total das células. A lisina, que é um aminoácido carregado positivamente, estrutura a água em cristais de gelo hexagonais (Figura 35f). Apesar dos tecidos terem apresentado lamelas danificadas (Figura 71), suas membranas internas mostraram-se intactas (Figura 74a). Um excesso de carga positiva pode ter tornado a coloração do tecido mais parda, uma vez que o azul de toluidina é um corante básico com propriedades metacromáticas podendo identificar constituintes celulares que contenham grupos aniônicos como paredes celulares e lamela média (Flint, 1994). De alguma forma, isto influenciou também a coloração ao reagir com tetróxido de ósmio, tornando os tecidos visualmente escuros.

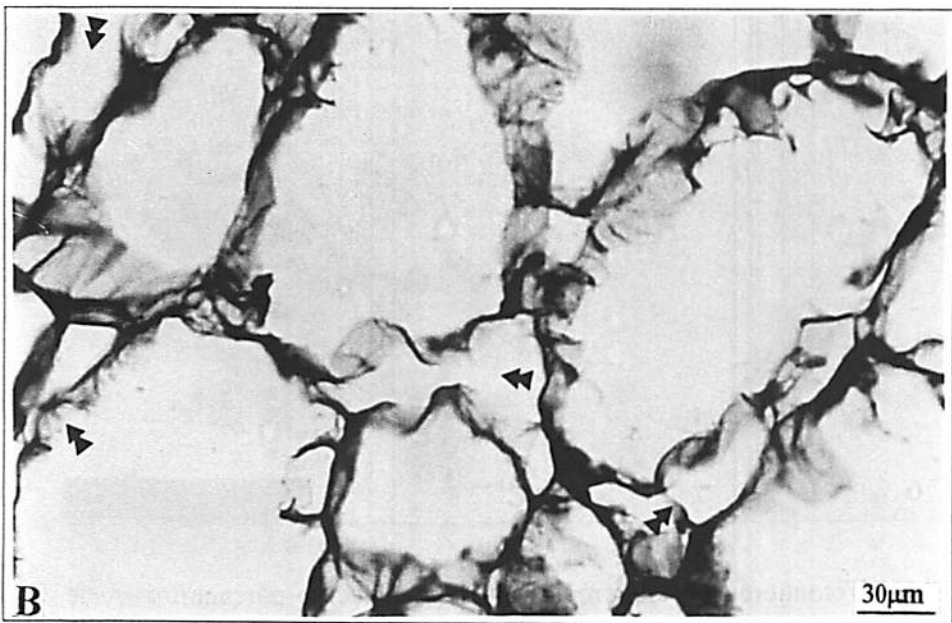
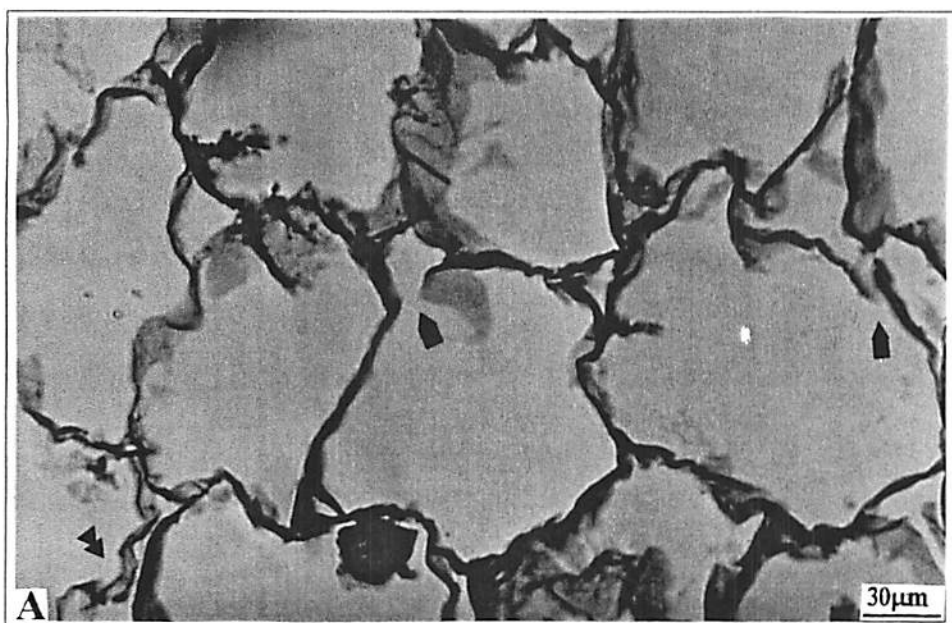


FIGURA 68 Células parenquimáticas de mesocarpo de frutos congelados após infusão com glicina 20%, apresentando perfurações e segregação celular. A) caqui e B) mamão. (►perfuração, ►segregação).

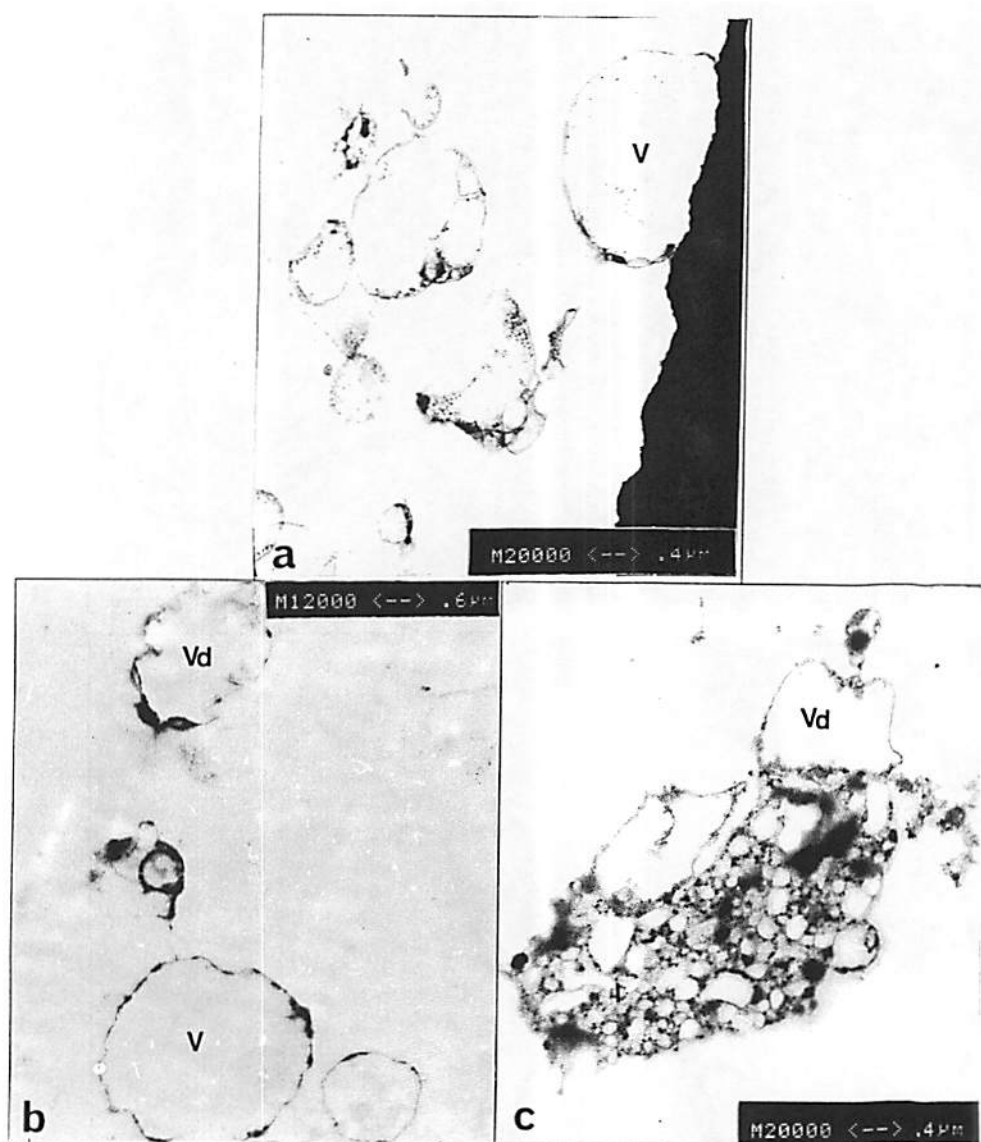


FIGURA 69 Fotomicrografias eletrônicas (MET) de tecido parenquimático de mamão congelado sem infusão (a) e após a infusão com glicina 20% (b e c). Os frutos infundidos com glicina apresentaram estruturas subcelulares distorcidas. v= vesícula, vd= vesícula distorcida.

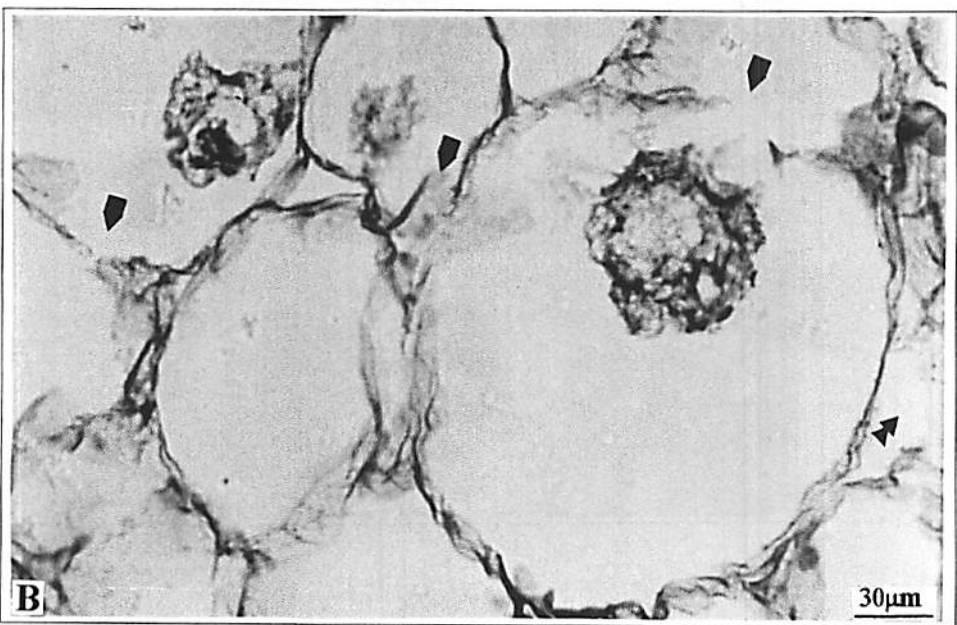
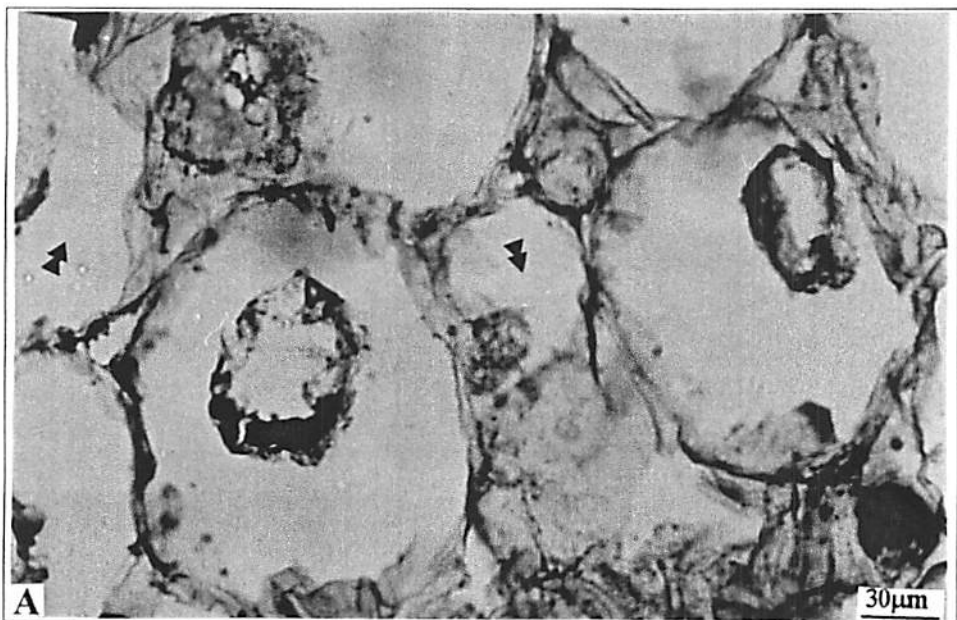


FIGURA 70 Células parenquimáticas de mesocarpo de mamão congelado (A e B) após infusão com lisina 20%, apresentando pouca segregação e algumas perfurações celulares. (▶perfuração, ▶segregação).



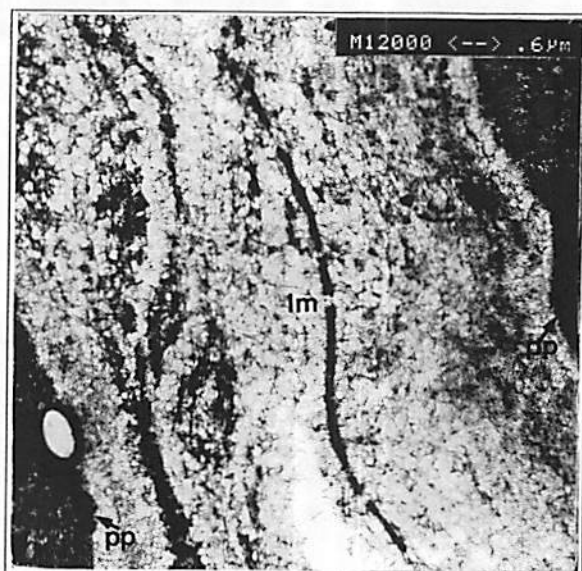


FIGURA 71 Fotomicrografia eletrônica (MET) de tecido parenquimático de mamão congelado após a infusão com lisina, apresentando danos na lamela média. pp= parede primária; lm= lamela média.



A menor intensidade de danos foi encontrada nos frutos submetidos a imersão em solução aquosa contendo prolina 20% anteriormente ao congelamento. Os tecidos apresentaram-se mais coesos e suas células menos perfuradas (Figura 72). Embora algumas vesículas tenham apresentado-se distorcidas (Figura 73a), a maioria de suas organelas, como mitocôndrias, e suas membranas internas pareceram bem conservadas (Figuras 73b e 74b). A prolina, apesar de ser um aminoácido hidrofóbico, é bastante solúvel em água e em altas concentrações promove a formação de cristais de gelo pequenos e arredondados. Membranas do núcleo, mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático podem ser danificadas em diferentes graus pelo congelamento intracelular (Bendas et al., 1996).

Devido aos tecidos terem uma estrutura heterogênea, é difícil determinar o grau de difusão das substâncias empregadas e a simples difusão das moléculas d'água não pode ser o principal fator de controle do crescimento de cristais de gelo (Wang, Barringer e Hansen, 1998). À medida em que um açúcar tenha menor tamanho molecular, tem um maior coeficiente de difusão, assim como a frutose tem um coeficiente 32% mais elevado do que a sacarose (Lerici et al., 1985). Isto facilita a sua distribuição pelo tecido, no entanto, a sacarose é mais eficiente como crioprotetor, justamente por ser uma molécula maior, com mais sítios ligantes e por reduzir a mobilidade da água no meio (Allen, Wood e McDonald, 1974).

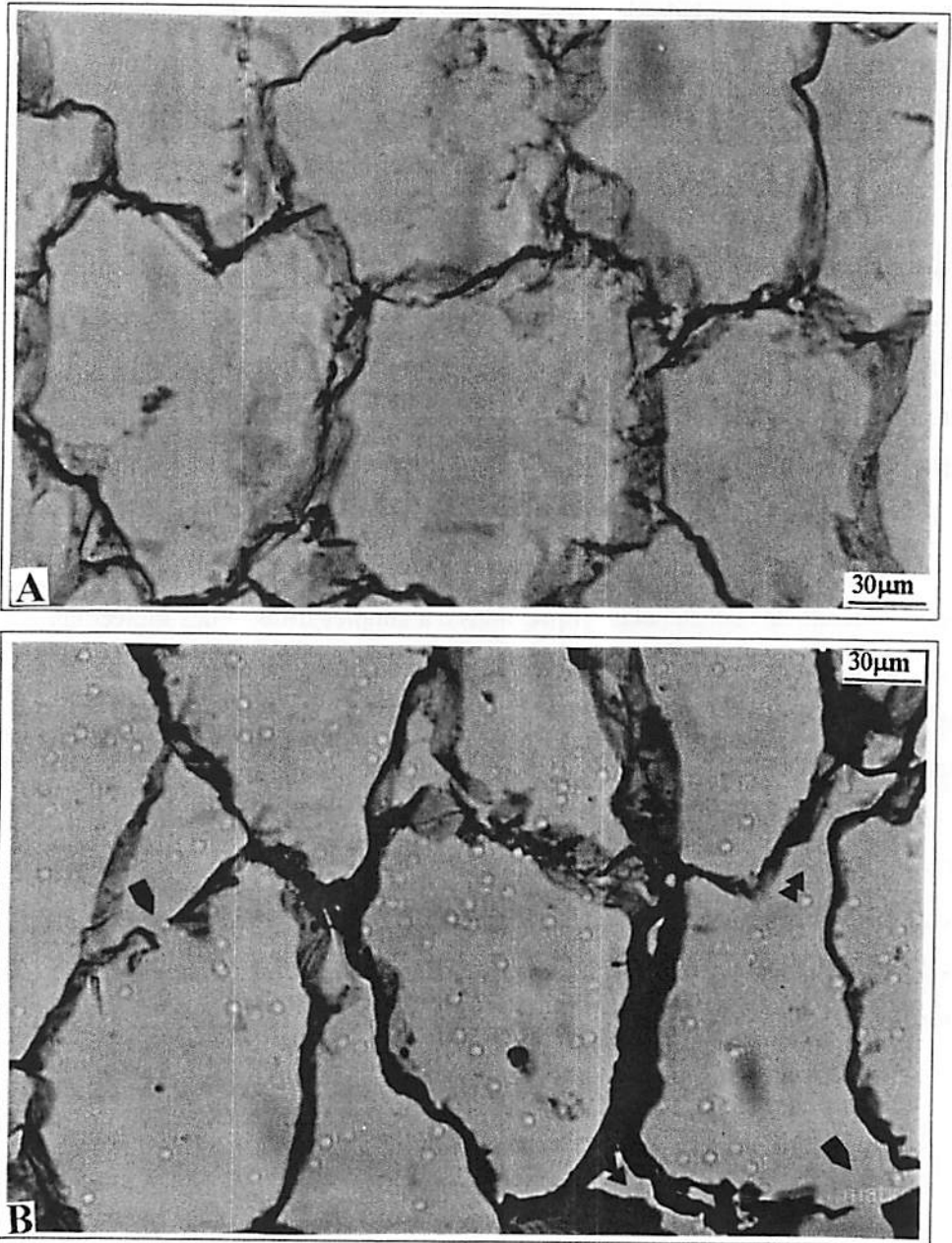


FIGURA 72 Células parenquimáticas de mesocarpo de frutos congelados após infusão com prolina 20%, apresentando-se mais preservados. A) caqui e B) mamão. (▶perfuração, ▶segregação).

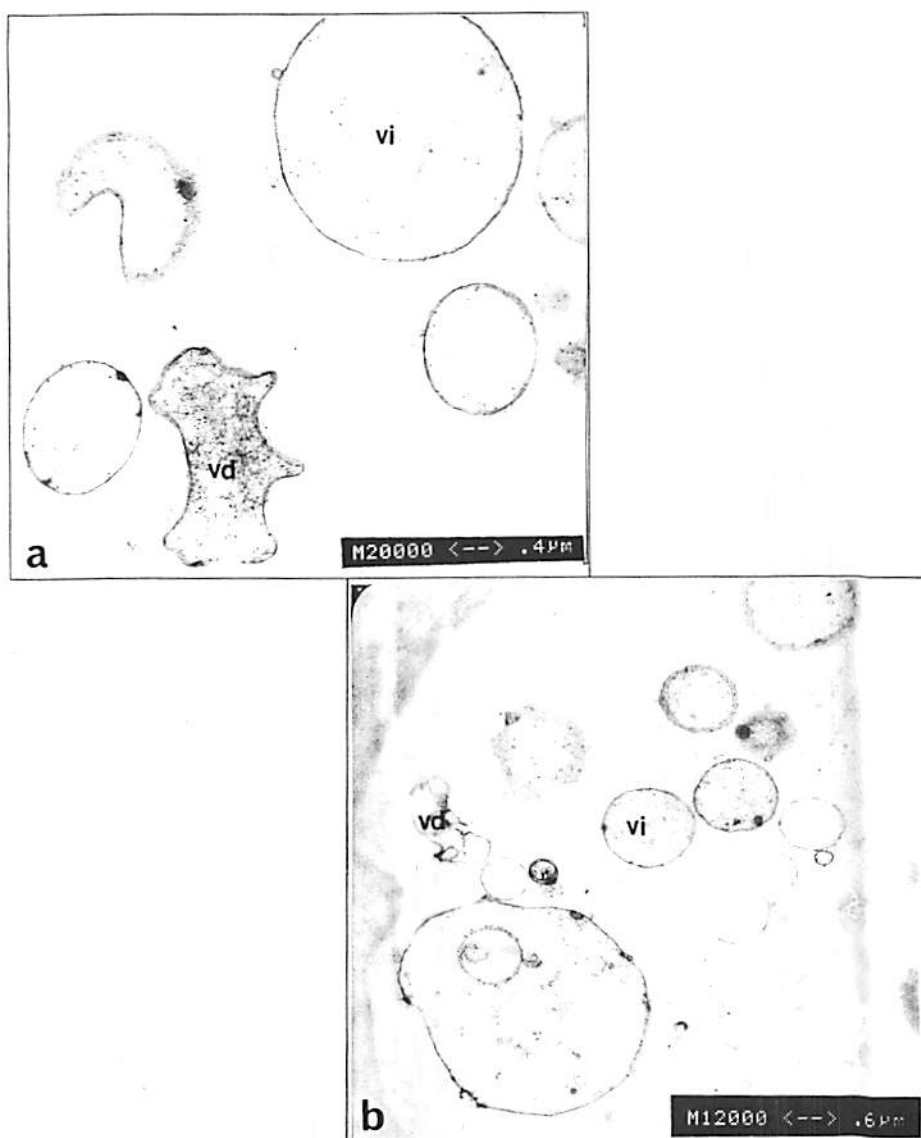


FIGURA 73 Fotomicrografias eletrônicas (MET) de tecido parenquimático de mamão congelado após a infusão com prolina (a e b), apresentando vesículas distorcidas (vd) e com membranas intactas (vi).

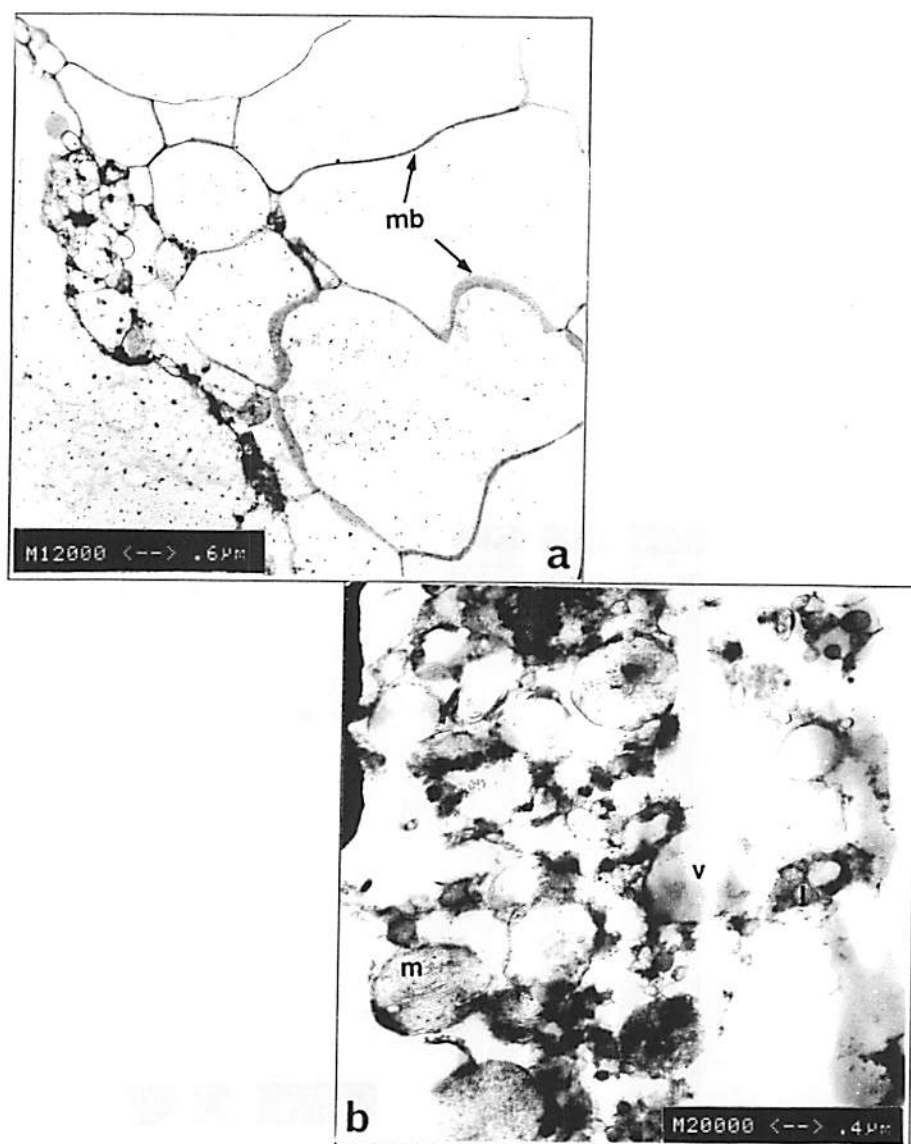


FIGURA 74 Fotomicrografias eletrônicas (MET) de tecido parenquimático de mamão congelado após a infusão com (a) lisina, apresentando membranas internas intactas e (b) prolina, mostrando organelas bem preservadas. mb= membrana; m= mitocôndria; v= vesícula.

Tecidos aparentemente pouco danificados podem apresentar sérias alterações em suas estruturas subcelulares, tendo destruída a sua organização interna e modificado o seu metabolismo, provocando, muitas vezes, a sua morte (Schäfer e Kaufmann, 1999). Os cloroplastos podem ser desintegrados e os vacúolos e vesículas desidratados, provocando reações indesejáveis, sendo a sobrevivência do tecido dependente da severidade dos danos a estas e outras estruturas internas.

A estruturação de cristais de gelo em frutas é dificultada pela sua composição química, estrutura, estado fisiológico, dimensões celulares, etc. A dificuldade em correlacionar o dano celular com a estruturação de cristais de gelo se deve, principalmente, à inabilidade de encontrarmos uma técnica apropriada que permita a observação direta da estruturação dentro do tecido.

No entanto, algumas indicações visuais puderam ser obtidas no comportamento dos tecidos durante o congelamento, em função das substâncias empregadas, não obstante não se disponha dos mecanismos envolvidos com absoluta certeza.

Estudos mais aprofundados são necessários para correlacionar e prever danos celulares em frutos a partir de estruturações de cristais de gelo.

## 5 CONCLUSÕES

Açúcares em solução aquosa promovem a estruturação hexagonal regular e dendrítica dos cristais de gelo que perfuram as paredes celulares com seus longos ramos e causam forte desidratação das células.

Vitaminas de caráter anfifílico nem sempre se comportam da mesma maneira. A estruturação que estas promovem depende da solubilidade das mesmas e da intensidade de hidrofobicidade de suas cadeias. A impregnação de uma vitamina anfifílica solúvel nas paredes celulares pode levar a um leve efeito de proteção destas estruturas pela exposição de sua porção hidrofóbica, reduzindo a formação de cristais de gelo na imediata vizinhança.

Aminoácidos influenciam diferentemente a estruturação dos cristais de gelo, mesmo dentro de um mesmo grupo. Aminoácidos, como a cisteína, ácido aspártico, glicina e prolina, sofrem o efeito-concentração, enquanto o ácido glutâmico e a metionina mantêm seus padrões independentemente da concentração. Cisteína, ácido glutâmico, prolina e glicina (baixas concentrações) promovem estruturações mais regulares do tipo hexagonal, enquanto a metionina e a glicina (altas concentrações) e, em especial o ácido aspártico, promovem a estruturação de longos cristais de gelo em forma de barras.

Dentre todos os tratamentos empregados nos frutos, o que apresentou melhor resultado foi o da infusão em solução aquosa contendo prolina a 20% pela capacidade que este aminoácido tem de promover a estruturação de pequenos e arredondados cristais de gelo, reduzindo o potencial de perfuração e segregação das células, assim como os danos a estruturas subcelulares.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. São necessários estudos mais aprofundados relacionando todas as possíveis implicações das diferentes estruturas do cristal de gelo no dano celular de frutos congelados. É possível que existam influências do fenômeno da recristalização durante períodos mais longos de armazenamento.
2. São necessárias técnicas de microscopia ótica e eletrônica mais precisas com vistas a quantificar o dano durante o processo. É possível que microscópios e acessórios de geração mais recente permitam uma melhor resolução e detalhamento.
3. Existem certamente mecanismos a serem propostos relacionando a morfologia em cristais de gelo e sua interação com a célula e diferentes componentes desta, definindo o grau do dano celular em frutos congelados. Estudos sobre a mobilidade molecular neste tipo de sistema deverão ser aprofundados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. New York:Garland Publ. Inc., 1983. cap.19. p.1181-1195.
- ALLEN, A.T., WOOD, R.M., McDONALD, M.P. Molecular association in the sucrose-water system. **Sugar Technology Reviews**, Amsterdam, v.2, p.165-180, 1974.
- ANZALDÚA-MORALES, A., BRUSEWITZ, G.H., ANDERSON, J.A. Pecan texture as affected by freezing rates, storage temperature, and thawing rates. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.2, p.332-335, 1999.
- ASHWORTH, E.N. The formation and distribution of ice within forsythia flower buds. **Plant Physiology**, New York, v.92, n.5, p.718-725, May. 1990.
- ASHWORTH, E.N., ABELES, F.B. Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues. **Plant Physiology**, New York, v.76, p.201-204, 1984.
- BAE, S.K., MIYAWAKI, O., YANO, T. Ice structure size in frozen agar gels analyzed by mercury porosimetry. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.57, n.10, p.1624-1627, 1993.
- 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.154-156, 1996.
- BENDAS, G., WILHELM, F., RICHTER, W., NUHN, P. Synthetic glycolipids as membrane-bound cryoprotectants in the freeze-drying process of liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v.4, p.211-222, 1996.
- BEST, D. New perspectives on water's role in formulation. **Prepared Foods**, London, v.161, n.9, p.59-66, ago. 1992.



- BORZSÁK, I., CUMMINGS, P.T.** Molecular dynamics simulation of ice XII. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v.300, p.359-363, Feb. 1999.
- BUDIAMAN, E.R., FENNEMA, O.** Linear rate of water crystallization as influenced by viscosity of hydrocolloid suspensions. **Journal Dairy Science**. Champaign, v.70, p.547-554, 1987.
- BURKE, M.J., GEORGE, M.F., BRYANT, R.G.** Water in plant tissues and frost hardiness. In: **DUCKWORTH, R.B. (ed.) Water Relations of Food**. New York: Academic Press. 1975. p.111-135.
- BUYONG, N., FENNEMA, O.** Amount and size of ice crystals in frozen samples as influenced by hydrocolloids. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.71, p.2630-2639, 1988.
- CALDWELL, K.B., GOFF, H.D., STANLEY, D.W.** A low-temperature scanning electron microscopy study of ice cream. II. influence of selected ingredients and processes. **Food Structure**, Chicago, v.11, p.11-23, 1992.
- CAL-VIDAL, J., CARNEIRO, C.S.** New technological approaches in cryopreservation of frozen fruits. In: **ACHEMA 2000. International Meeting on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology**. Frankfurt : Main, 2000. p.247-249.
- CAL-VIDAL, J., CARNEIRO, C.S.** Estruturação de cristais de gelo com vistas à redução do dano físico-mecânico em frutos congelados. In: **ENCONTRO DE QUÍMICA DE ALIMENTOS, 5, 2001. Proceedings...** Porto, (no prelo).
- CAMERON, I.L., HUNTER, K.E., FULLERTON, G.D.** Quench cooled ice crystal imprint size: a micro-method for study of macromolecular hydration. In: **NEGENDANK, W., EDELMANN, L. (eds.) The state of water in the cell**. Chicago:Scanning Microscopy International, 1988. p.75-88.
- CARNEIRO, C.S.** Estruturação e morfologia de cristais de gelo sob a influência de concentrações e combinações de substâncias diversas. 1997. 135p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CARNEIRO, C.S., CAL-VIDAL, J.** Ice crystal structuring as affected by amphiphilic substances. In: **SCANNING, The Journal of Scanning Microscopies**. Baltimore, v.20, n.3, p.244-246, 1998a.

- CARNEIRO, C.S., CAL-VIDAL, J. Structuring capacity of ice crystals under the influence of sugars with diverse chemical nature. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROPERTIES OF WATER**, 7, 1998, Helsinki, **Proceedings....** Finlandia: University Press, 1998b. p.1-4.
- CARNEIRO, C.S., CAL-VIDAL, J. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. Brasília, v.35, n.2, p.423-432, 2000a.
- CARNEIRO, C.S., CAL-VIDAL, J. Azúcares en solución acuosa y su influencia en la estructuración de cristales de hielo. **Revista Enfoque Alimentación**. Buenos Aires, v.1, n.6, p.34-37, 2000b.
- CARNEIRO, C.S., CAL-VIDAL, J. Ice Crystal Structuring as Affected By Aminoacid Type Substances. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD**, 8, 2000, Puebla. **Proceedings...** México: Technominics Press, 2000c. v.1, p.747-751.
- CARNEIRO, C.S., CAL-VIDAL, J. Cell damage in frozen fruits as related to ice crystal structuring. In: **CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS**, 3, 2001. **Proceedings...** Valência (no prelo).
- CARPITA N.C., GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v.3, n.1, p.1-30, 1993.
- CHAKRABARTTY, A., HEW, C.L. The effect of enhanced  $\alpha$ -helicity on the activity of a winter flounder antifreeze polypeptide. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 202, p.1057-1063, 1991.
- CHAMBERS, R., HALE, H.P. Formation of ice in protoplasm. **Process Royal Society London**, v.110, p.336, 1932.
- CHARM, S.E. **The Fundamentals of Food Engineering**. Westport: The AVI Publish. Comp., Inc., 1971. 629p.
- CHAROENREIN, S., GODDARD, M., REID, D.S. Effect of solute on the nucleation and propagation of ice. In: LEVINE, H., SLADE, L. (eds.) **Water Relationships in Food**. New York: Plenum Press, 1991. p.191-198.

CHEFTEL, J.C., CHEFTEL, H., BESANÇON, P. **Introdução a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos**, Zaragoza: Editorial Acribia, 1982. v.2, 404p.

CHEN, P.; CHEN, X. D.; FREE, K.W. Solute inclusion in ice formed from sucrose solutions on a sub-cooled surface –an experimental study. **Journal of Food Engineering**, London, v.38, p.1-13, 1998.

CHEVALIER, D., LE BAIL, A., GHOUL, M. Freezing and ice crystals formed in a cylindrical food model: part I. Freezing at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, London, v.46, n.4, p.277-285, Dec. 2000a.

CHEVALIER, D., LE BAIL, A., GHOUL, M. Freezing and ice crystals formed in a cylindrical food model: part II. Comparison between freezing at atmospheric pressure and pressure-shift freezing. **Journal of Food Engineering**, London, v.46, n.4, p.287-293, Dec. 2000b.

CHINACHOTI, P. Water mobility and its relation to functionality of sucrose-containing food systems. **Food Technology**. Chicago, v.47, n.1, p.134-140, 1993.

CHOU, D., MORR, C., Protein-water interactions and functional properties. **Journal American Oil Chemistry Society**. Chicago, v.56, p:53A-62A, 1979.

CLEGG, J.S. Contrasting views on the organization of citoplasm. In: NEGEN-DANK, W., EDELMANN, L. (eds.) **The state of water in the cell**. Chicago: Scanning Microscopy International, 1988. p.105-114.

COTTRELL, J. I. L., PASS, G., PHILLIPS, G. O. Assessment of polysaccharides as ice cream stabilizers. **Journal of the Science Food and Agriculture**, Oxford, v.30, p.1085, 1979.

CROWE, J.H., CROWE, L.M., Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. In: LEOPOLD, A. C. (ed.) **Membranes, metabolism and dry organisms**. Ithaca: Cornell University Press. 1986. p.188-209.

CROWE, J.H., CROWE, L.M., CARPENTER, J.F., RUDOLPH, A.S., WISTRUM, C.A., SPARGO, B.J., ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. **Biochemical Biophysical Acta**, Amsterdam, v.947, p.367-384, 1988.

- CROWE, J.H., CROWE, L.M., CHAPMAN, D. Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Archives of Biochemistry Biophysics*, New York, v.232, p.400-407, 1984.
- DE ALMEIDA, K., CARNEIRO, C. S., CAL-VIDAL, J. Resistencia al congelamiento. *Revista Énfasis Alimentación*. Buenos Aires, v.7, n.1, p.90-93, fev./mar. 2001.
- DeMAN, J.M., VOISEY, P.W., RASPER, V. F. STANLEY, D.W. *Theology and texture in food quality*. Westport: The Avi Publ., 1979. 588p.
- DeVRIES, A.L. Role of glycopeptides and peptides in inhibition of crystallization of water. *Phil. Trans. Royal Society London*, v.304, p.575-587, 1984.
- DICK, D.A.T. Water movement in cells. In: BITTAR, E.E. (ed.) *Membranes and Ion Transport*. London: Wiley Interscience, 1971. p.20-33.
- DREWES, J.A., ROWLEN, K.L. Evidence for a  $\gamma$ -turn motif in antifreeze glycopeptides. *Biophysical Journal*, New York, v.65, p.985-991, 1993.
- DUCE, S.L., CARPENTER, T.A., HALL, L.D. Nuclear magnetic resonance imaging of fresh and frozen courgettes. *Journal Food Engineering*, London: Elsevier Science. v.16, p.165-172, 1992.
- ECHLIN, P. *Low-Temperature Microscopy and Analysis*. New York: Plenum Press, 1992. 539p.
- EDWARDS, M., HALL, M. Freezing for quality. I. *Food Manufacture*, London, v.63, n.3, p.41-45, mar. 1988.
- ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Solid state of matter, Chicago: The University of Chicago, 1976. p.1032-1044.
- 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. Water and protein hydration. In: J. WHITAKER E S. TANNENBAUM (eds.). *Food Proteins*. Westport: The Avi Publ., 1977. p.50-90.

FENNEMA, O. R. Water and ice, In: FENNEMA, O. R. (ed.). **Food Chemistry**. New York: Marcel Decker, 1996. p.17-94.

FENNEMA, O. R., POWRIE, W. D. Fundamentals of low-temperature food preservation. **Advance Food Research**, New York, v.13, p.219-347, 1964.

FESSAS, D., SCHIRALDI, A. State diagrams of arabinoxylan-water binaries. **Thermochimica Acta**, London: Elsevier Sci., v.370, n.1-2, p.83-89, Abr. 2001.

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.

FLINT, O. **Food microscopy: a manual of practical methods, using optical microscopy**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994. 125p.

FRANKS, F. Water, ice and solutions of simple molecules. In: DUCKWORTH, R. (ed.) **Water Relations in Foods**. York: Academic Press Inc., 1975. p.3-22.

FRANKS, F. **Biophysic and Biochemistry at low temperatures**. Cambridge: Cambridge University Press. 1985.

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./Dec. 1994.

GARRETT, R.H., GRISHAM, C.M. **Biochemistry**. Orlando:Saunders College Publ. 1995. 1100p.

GLASSTONE, S. **Textbook of Physical Chemistry**. Princeton: D. Van Nostrand, 1946.

GLEESON, J. T., ERRAMILI, S., GRUNER, S.M. Freezing and melting water in lamellar structures. **Biophysical Journal**, New York, v.67, p.706-712, Ago. 1994.

- GLINKA, Z., REINHOLD, L. Induced changes in permeability of plant cell membranes to water. **Plant Physiology**, New York, v.49, p.602-606, 1972.
- GODWIN, T.W., MERCER, E.I. The plant cell wall. In: **Introduction to Plant Biochemistry**. Oxford: Pergamon Press. 1982. cap.4, p.55-91.
- 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.3, p.1268-1277, Mar. 1993.
- GOLOVKIN, N. A., TSCHERNICHEV, V.M. About some dependencies of the crystallization processes of ice in the plant tissue. **Kholodil'naya Tekhnika**, Moscow, v.44, n.2, p.29-35, 1967.
- 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./Oct. 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, Feb. 1992.
- GRUDA, Z., POSTOLSKI, J. **Tecnologia de la congelacion de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1981. 631p.
- GUEGOV, Y. Functional dependence between cryoscopic temperature and solid content in grapes of the 'Bolgar' variety. **Nautschni. Tr. NIIKP**, Plovdiv, v.9, p.23-37, 1972.
- GUEGOV, Y. **Investigations on the phase transition during refrigeration processing of foods of plant origin**. 1978. Tese (Doutorado) – Higher Institute for Food Industries, Plovdiv.
- GUEGOV, Y. General dependencies between the cryoscopic temperature and the soluble solid content of some fruits. **Balgarski Plodove, Zelentchutsii Konservii**, Plovdiv, n.8, p.9-14, 1979a.
- GUEGOV, Y. **Investigations on the cryoscopic temperature of fruits and vegetables. I. Fruits**. **Nautschni Tr. NIIKP**, Plovdiv, v.15, p.127-141, 1979b.

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.

HARTEL, R.W., CHUNG, M. S. Contact nucleation of ice fluid dairy products. **Journal of Food Engineering**, London, v.18, n.2, p.281-296, Feb, 1993.

HAYES, G.D. **Manual de datos para ingenieria de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1987. 182p.

HENDRIX, D. L., GHEGAN, R.C. Quality changes in bulk stored citrus concentrate made from freeze-damaged fruit. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, p.1570-1572, 1980.

HILLS, B. P., REMIGEREAU, B. NMR Studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.38, n.1, p.51-61, 1997.

UNILEVER (United Kingdom) Christopher Brunsten Holt; Lia Helen Telford. **Frozen confection**. GB n. WO93/21778, 11 Nov. 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, Mar. 1995.

HORNE, R.A. **Water properties**. Woods Hole Oceanographic Institution. 1970. v. 21, p.668-688.

ILKER, R., SZCZESNIAK, A. S. Structural and chemical bases for texture of plant foodstuffs. **Journal Texture Studies**, Connecticut, v.21, p.1-36, 1990.

JOHARI, G. P., HALLBRUCKER, A., MAYER, E. The glass-liquid transition of hyperquenched water. **Nature**, London, v.330, p.552-553, 1987.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 298p.

KALICHEVSKY, M. T., KNORR, D., LILLFORD, P.J. Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. **Trends in Food Science and Technology**. v.6, p.253-259, ago. 1995.

- KASAHARA, I., JIMÉNEZ, G. Comportamiento de la texture de chirimoya al proceso de congelación. *Alimentos*, Valparaiso, v.15, n.6, p.9-16, 1990.
- KINDEL, P.K., LIAO, S.Y., LISKE, M.R., OLIEN, C.R. Arabinoxylans from rye and wheat seed that interact with ice. *Carbohydrate Research*, Amsterdam: v.187, p.173-185, 1989.
- KNIGHT, C.A., CHENG, C.C., DeVRIES, A.L. Adsorption of  $\alpha$ -helical anti-freeze peptides on specific ice crystal surface planes. *Biophysical Journal*, New York, v.59, p.409-418, Feb. 1991.
- KNIGHT, C.A., DeVRIES, A.L. Effects of a polymeric, nonequilibrium 'anti-freeze' upon ice growth from water. *Journal Crystal Growth*. Amsterdam., v.143, p.301-310, 1994.
- KNIGHT, C.A., DeVRIES, A.L., OOLMAN, L.D. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature*, London, v.308, n.5956, p.295-296, mar. 1984.
- KNIGHT, C.A., DRIGGERS, E., DeVRIES, A.L. Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8. *Biophysical Journal*, New York, v.64, p.252-259, Jan. 1993.
- KOSTER, K.L., LYNCH, D.V. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiology*, New York, v.98, n.3, p.108-113, Mar. 1992.
- KRAMER, P.J. *Water Relations of Plants*. New York: Academic Press. 1983. 391p.
- KRAMER, P.J, BOYER, J. S. *Water relations of plants and soils*. New York: Academic Press. 1995, 495p.
- KRAUS, J.E., ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica: Universidade Rural, 1997. 198p.
- KRAUS, E.H., HUNT, W.F., RAMSDELL, L.S., *Mineralogy: an introduction to the study of minerals and crystals*. New York: McGraw-Hill, 1959. 686p.
- LEHNINGER, A. L. *Biochemistry*. New York: Worth Publishers Inc., 1970. 1103p.



- LENIGER, H. A., BEVERLOO, W. A.; **Food Process Engineering**. Boston: D. Reidel Publ., 1975. 632p.
- LERICI, C.R., PALLOTTA, U. Su alcuni aspetti del congelamento dell' acqua nei sistemi biologici. **Scienza e Tecnologia degli Alimenti**, Milan, v.2, n.4, p.203-213, 1972.
- LERICI, C.R., PINNAVAIA, G., DALLA ROSA, M., BARTOLUCCI, L. Osmotic dehydration of fruits: influence of osmotic agents on drying behaviour and product quality. **Journal of food Science**, Chicago, v.50, p.1217-1226, 1985.
- LEVINE, H., SLADE, L. Principles of cryostabilization technology from structure/property relationships for carbohydrate/water systems. **Cryo Letters**. v.9, p.21-63, 1988.
- LEVINE, H., SLADE, L. Interpreting the behavior of low moisture foods. In: HARDMAN, T. M. (ed.) **Water and food quality**. London: Elsevier Science, 1989. p.71-134.
- LEVINE, H., SLADE, L. Cryostabilization technology: thermoanalytical evaluation of food ingredients and systems. In: MA, C.Y.; HARWALKAR, V.R (eds.) **Thermal analysis of foods**. London: Elsevier Science. 1990. p.221-305.
- LEVITT, J. **Response of plants to environmental stresses**. New York: Academic Press. 1980. v.1, p.228-230.
- LÉVY, J., DUMAY, E., KOLODZIEJCZYK, E., CHEFTEL, J.C. Freezing kinetics of a model oil-in-water emulsion under high pressure or by pressure release. Impact on ice crystals and oil droplets. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, New York, v.32, n.7, p.396-405, Nov. 1999.
- LILLFORD, P.J., HOLT, C. B. Antifreeze proteins. **Journal Food Engineering**, London, v.22, p.475-482, 1994.
- LIM, M.H., REID, D.S. Studies of reaction kinetics in relation to the Tg' of polymers in frozen model systems. In: LEVINE, H., SLADE, L. (eds.) **Water relationships in foods**. New York: Plenum Press, 1991. p.103-122.
- LING, G.N. The physical state of water in biological systems. **Food Technology**, Chicago, v.22, n.6, p.1254-1258, out. 1968.

- LUCK, W. A. Structures of water in aqueous systems. In: STEWART, G.F.; ROCKLAND, L. (eds.) **Water Activity: Influences on Food Quality**. New York: Academic Press, 1981. p.407-434.
- LUYET, B.J. On the growth of the ice phase in aqueous colloids. **Process Royal Society**, London, v.147, p.434-451, 1957.
- LUYET, B.J. On the mechanism of growth of ice crystals in aqueous solutions and on the effect of rapid cooling in hindering crystallization. In: \_\_ **Recent Research in freezing and drying 1960**, 1960. p.3-22
- LUYET, B.J. The formation of ice and the physical behavior of the ice phase in aqueous solutions and in biological systems. In: HAWTHORN, J., ROLFE, E.J. (eds.) **Low temperature biology of foodstuffs**. Oxford: Pergamon Press, 1968. p.125-133.
- MACKENZIE, A P. Collapse during freeze-drying - qualitative and quantitative aspects. In: GOLDBLITH, S. A., REY, L., ROTHMAYR, W.W. (eds.). **Freeze Drying and Advanced Food Technology**. New York: Academic Press Inc., 1975a. p. 277-308.
- MACKENZIE, A. P. The physico-chemical environment during the freezing and thawing of biological materials. In: DUCKWORTH, R.B. (ed.) **Water Relations of Food**. New York: Academic Press. 1975b. p.477-525.
- MACKENZIE, A. P., RASMUSSEN, D. H., MACAULAY, M.N. **Society Cryobiology**, 10<sup>th</sup> Annual Meeting. Florida. 1973.
- MALTINI, E. Studies on the physical changes in frozen aqueous solution by DSC and microscopic observations. **Annual Istituto Superior de Valorizzazione Tecnologica de Productio Agricola**, Milano, v.8, p.107-119, 1977.
- MALTINI, E., ANSELMINI, 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.
- MARTÍNEZ-MONZÓ, J., MARTÍNEZ-NAVARRETE, N., CHIRALT, A., FITO, P. Mechanical and structural changes in apple (var. Granny smith) due to vacuum impregnation with cryoprotectants. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.3, p.499-503, 1998.

- MARTINO, M. N., OTERO, L., SANZ, P. D., ZARITZKY, N.E. Size and location of ice crystals in pork frozen by high-pressure-assisted freezing as compared to classical methods. *Meat Science*, London, v.50, n.3, p.303-313, 1998.
- MARUYAMA, M., ASHIDA, T., KNIGHT, C.A. Disk crystals of ice grown in air-free water: no effect of dissolved air on the morphology. *Journal Crystal Growth*. Amsterdam , v.205, p.391-394, 1999.
- MARUYAMA, M., KISHIMOTO, Y. SAWADA, T. Optical study of roughening transition on ice  $I_h$  (0110) planes under pressure. *Journal Crystal Growth*. Amsterdam, v.172, p.521-527, 1997.
- MATZ, S. A. *Water in Foods*. Westport: The Avi Publ. 1965. 275p.
- MAYER, E., HALLBRUCKER, A. *Nature*, London, v.325, p.601-602, 1987.
- MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *Journal Genetic Physiology*, Provincetown, v.47, p.347-369, 1963.
- McCANN, M.C., ROBERTS, K. Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal Experimental Botany*, Oxford, v.45, p.1683-1691, Nov. 1994.
- 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./Dec. 1994.
- MERYMAN, H. T. General principles of freezing and freezing injury in cellular materials. *Annals New York Academic Science*, v.85, p.503-509, 1960.
- METZLER, D.E. *Biochemistry*. New York: Academic Press Inc, 1977. 1129p
- MEYER, L.H. Development of food chemistry. In: \_\_\_\_\_ *Food Chemistry*. Westport: The Avi Publ., 1960. p.6-8.
- MIYAWAKI, O., ABE, T., YANO, T. Freezing and ice structure formed in protein gels. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v.56, n.6, p.953-957, Nov./Dec. 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.
- MODLIBOWSKA, I. Ice formation within plants, the resulting damage and recovery. In: HAWTHORN, J., ROLFE, E.J. (eds.) **Low temperature biology of foodstuffs**. Oxford: Persimmon Press, 1968. p.125-133.
- MOHR, W. P. Freeze-thaw (and blanch) damage to vegetable ultrastructure. **Journal Texture Studies**, Westport , v.5, p.13-27, 1974.
- MONZINI, A., MALTINI, E. Aspetti tecnici della congelazione e qualità dei prodotti, **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.23, n.220, p.749-770, out. 1984.
- MORRISON, R.T., BOYD, R.N. **Química Orgânica**. 8.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983. 1510p.
- MUJUMDAR, A.S. **Handbook of Industrial Drying**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1995. v.1, cap. 22.
- NADA, H., FURUKAWA, Y. Anisotropic properties of ice/water interface: a molecular dynamics study. **Japanese Journal of Applied physics**, Tokyo, v.34, n.2A, p.583-588, 1995.
- NADA, H., FURUKAWA, Y. Anisotropic growth of ice crystals from water studied by molecular dynamics simulation. **Journal Crystal Growth**. Amsterdam , v.169, p.587-597, 1996.
- NADA, H., FURUKAWA, Y. Anisotropy in molecular-scaled growth kinetics at ice-water interfaces. **Journal Physical Chemistry**, Washington, v.101, n.32, p.6163-6166, 1997.
- NADA, H., FURUKAWA, Y. Anisotropy in structural transitions between basal and prismatic faces of ice studied by molecular dynamics simulation. **Surface Science**, Amsterdam, v.446, n.1-2, p.1-16, Feb. 2000.
- NÉMETHY, G. Structure of water and of aqueous solutions. **Cryobiology**, New York, v.3, n.1, p.19-26, 1966.
- NÉMETHY, G., SCHERAGA, H. A. Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. I. A model for the thermodynamic properties of liquid

water. **Journal of Chemical Physics**, New York, v.36, n.12, p.3382-3400, June 1962a.

NÉMETHY, G., SCHERAGA, H. A. Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. II. A model for the thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrocarbons. **Journal of Chemical Physics**. New York, v.36, n.12, p.3401-3417, June 1962b.

NIKLAS, K. J. **Plant biomechanics: An engineering approach to plant form and function**. Chicago: The University of Chicago Press. 1992, 607p.

OHSAKA, K., TRINH, E.H. Apparatus for measuring the growth velocity of dendritic ice in undercooled water. **Journal Crystal Growth**. Amsterdam, v.194, n.1, p.138-142, nov. 1998.

PARKIN, K.L., MARANGONI, A., JACKMAN, R.L., YADA, R.Y., STANLEY, D.W. Chilling injury. A review of possible mechanisms. **J. Food Biochemistry**, Connecticut, v.13, p.127-153, 1989.

PARTMANN, W. The effects of freezing and thawing on food quality. In: DUCKWORTH, R.B. (ed.) **Water Relations of Food**. New York: Academic Press, 1975. p.505-537.

POPMARINOV, P. **Principles of the refrigeration technique and general tecnology**. Bulgária: Plovdiv, 1964. 354p.

PORTMANN, M.O., BIRCH, G. Sweet taste and solution properties of  $\alpha,\alpha$ -trehalose. **Journal of Science Food Agricultural**, London, v.69, p.275-281, 1995.

POWRIE, W.D., TUNG, M.A. Electron microscopy in the study of immobilized water. In: DUCKWORTH, R.B. (ed.) **Water Relations of Food**. New York: Academic Press. 1975. p.249-269.

PRESTON, E. D. **The physical biology of plant cell walls**. London: Chapman and Hall, 1974.

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, set./out. 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, 1975. p.3-16.
- RAJASHEKAR, C. B., BURKE, M.J. Freezing characteristics of rigid plant tissues. **Plant Physiology**, New York, v.111, p.597-603, 1996.
- RAPATZ, G., LUYET, B. On the mechanism of ice formation and propagation in muscle. **Biodynamica**, v.8, p.121-144, 1959.
- RASMUSSEN, D., LUYET, B. Complementary study of some nonequilibrium phase transitions in frozen solutions of glycerol, ethylene glycol, glucose and sucrose. **Biodynamica**, v.10, p.319-331, 1969.
- REID, D.S. Fundamental physicochemical aspects of freezing. **Food Technology**, Chicago, v.37, n.1, 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**. 1995. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- RESENDE, J.V., CAL-VIDAL, J. Reducing freeze damage in fruits. In: **International Congress on Engineering and Food**, 7, 1997, Brighton. **Proceedings...** London: Sheffield Academic Press, 1997. p. SA1-SA4.
- REY, L. **Conservation de la vie par le froid**. Hermann, 1959. 353p.
- ROOS, Y. H. Glass transition-related physicochemical changes in foods. **Food Technology**. Chicago, v.49, n.10, p.97-102, out. 1995.
- 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. 380p.
- ROOS, N., MORGAN, A.J. **Cryopreparation of thin biological specimens for electron microscopy: methods and applications**. New York: Oxford University Press, 1990. 109p.
- ROTSTEIN, E., CORNISH, A.R.H. Influence of cellular membrane permeability on drying behavior. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, p.926-934, 1978.

- RUNNELS, L.K. Ice. **Scientific American**, Madison, v.215, n.6, p.2-9, Dec. 1966.
- SAKAI, A., LARCHER, W. **Frost survival in plants: responses and adaptation to freezing stress**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. 529p.
- SANTOS, I.R.I. **Disiccation and freezing tolerance of embryonic axes and lateral buds of citrus spp: implications for germplasm conservation**. 1999. 159p. Tese (Doutorado) - Colorado State University, Colorado.
- SANZ, P. D., OTERO, L., ELVIRA, C., CARRASCO, J. A. Freezing processes in high-pressure domains. **International Journal Refrigeration**, Paris, v.20, n.5, p.301-307, 1997.
- SCHÄFER, A. TH., KAUFMANN, J. D. What happens in freezing bodies? Experimental study of histological tissue change caused by freezing injure. **Forensic Science International**, Lausanne, v.102, n.2-3, p.149-158, June 1999.
- SCHNEIDER, E.F. **Journal Experimental Botany**, v.77, n.5 , p.1021, 1972.
- SCHNEPF, M. Protein-water interactions. In: HARDMAN, T. M. (ed.). **Water and Food Quality**. London: Elsevier Science, 1989. p.135-168.
- SCHOOF, H., BRUNS, L., FISCHER, A., HESCHEL, I., RAU, G. Dendritic ice morphology in unidirectionally solidified collagen suspensions. **Journal Crystal Growth**. Amsterdam, v.209, p.122-129, 2000.
- SHAW, P. E. Decreased hydrogen sulfide content in Valencia oranges after freeze damage. **Phytochemistry**, London, v.23, n.5, p.1175-1176, 1984.
- SHICHIRI, T. Faceted ice crystals grown in water without air. **Journal Crystal Growth**. Amsterdam, v.187, p.133-137, 1998.
- 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./Apr. 1985.
- SHOMER, I. Mechanism of structural freezing injury in citrus fruit segments. **Botanical Gazette**, Chicago, v.147, n.1, p.55-64, 1986.

- SHOMER, I., BOROCHOV-NEORI, H., LUZKI, B., MERIN, U. Morphological, structural and membrane changes in frozen tissues of madjhoul date (*Phoenix dactylifera* L.) fruits. *Postharvest Biology and Technology*, London, v.14, p.207-215, 1998.
- SIMATOS, D. Structure du produit pendant la congélation, la dessiccation et à l'état lyophilisé. *Bulletin Institut International du Froid*, v.56, n.1, p.227, 1976.
- SIMATOS, D., BLOND, G., DAUVOIS, P., SAUVAGEOT, F. *La lyophilisation: principes et application*. Paris: Association Nationales de la Recherche Technique, 1975a. 569p.
- SIMATOS, D., FAURE, M., BONJOUR, E., COUACH, M. The physical state of water contents as studied by differential thermal analysis and differential scanning calorimetry. *Cryobiology*, New York, v.12, n.3, p.202-208, 1975b.
- 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.
- SLADE, L., LEVINE, H. Beyond water activity: Recent advances based on an alternate approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, v.30, p.115-360, 1991.
- SLOVÁK, J., TANAKA, H., KOGA, K., ZENG, X.C. Computer simulation of water-ice transition in hydrophobic nanopores. *Physica A: statistical mechanics and its applications*, London, v.292, n.1-4, p.87-101, Mar. 2001.
- SMITH, A. U. Effects of low temperature on living cells and tissues. In: HARRIS, R.J.C. (ed.). *Biological Application of freezing and dryig*. New York: Academic Press, 1954. p.7-86.
- SMITH, A. U. *Biological effects of freezing and supercooling*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1962. 252p.
- SÖNNICHSEN, F. D., DeLUCA, C.I., DAVIES, P. L., SYKES, B. D. Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetic of the protein-ice interaction. *Structure*, Amsterdam, v.4, p.1325-1337, Nov. 1996.



SPIESS, W.E.L. Impact of freezing rates on product quality of deep-frozen foods. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 2**, and **EUROPEAN FOOD SYMPOSIUM, 8**, 1980, Helsinki. **Proceeding...** Helsinki: Elsevier Science, 1980. p.689-94.

STRYER, L. **Biochemistry**. New York: Freeman and Company. 1988. 1089p.

SUGGETT, A., Water-carbohydrate interactions. In: DUCKWORTH, R. (ed.) **Water Relations in Foods**. York: Academic Press Inc., 1975. p.23-36.

SUGGETT, A. Molecular motion and interactions in aqueous carbohydrate solutions III. A combined nuclear magnetic and dielectric -relaxation strategy. **Journal Solution Chemical**, v.5, p.33-46, 1976.

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: **INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 7**, 1997, Brighton. **Proceedings...** London: Sheffield Academic Press, 1997. p. G25-G28.

SUTTON, R.L. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. **Cryobiology**, New York v. n., p.585-598, 1992.

TAIT, M.J., SUGGETT, A., FRANKS, F. ABLETT, S., QUICKENDEN, P.A. Hydration of monosaccharides: A study by dielectric and nuclear magnetic relaxation. **Journal Solution Chemical**, v.1, n.2, p.131-151, 1972.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**, California: The Benjamin/Cummings Publish., 1991, cap.3, p.62-63.

TAYLOR, J.R.N. Glassy-state molecular mobility. **Food Industries of South Africa**, Pretoria, v.48, n.3, p.29-31, Mar. 1995.

TAYLOR, R. J. **Water**. London: Unilever Ltda. 1969. n.5, 16p.

TESTOLIN, R., COSTA, G. Ice nucleation temperatures in kiwifruit. **Scientia Horticulturae**, London, v.61, p.29-36, 1995.

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.

- TIRMIZI, S.H., GILL, W.N. Effect of natural convection on growth velocity and morphology of dendrite ice crystals. *Journal Crystal Growth*. Amsterdam, v.85, n.3, p.488-502, 1987.
- WANG, S.T., BARRINGER, S. A., HANSEN, P. M. T. Effects of carboxymethylcellulose and guar gum on ice crystal propagation in a sucrose-lactose solution. *Food Hydrocolloids*, London., v.12, p.211-215, 1998.
- WINTON, A.L., WINTON, K.B. The structure and composition of foods. New York: John Wiley e Sons Inc., 1949. v.2: 1060p.
- WISNIEWSKI, M., DAVIS, G. Immunogold localization of pectin's and glycoproteins in tissues of peach with reference to deep supercooling. *Trees*, Crawley, v.9, n.5, p.253-260, 1995.
- WOINET, B., ANDRIEU, J., LAURENT, M. Theoretical and experimental study of mean ice crystal size in model frozen foods. In: *INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD*, 7, 1997, Brighton. *Proceedings...* London: Sheffield Academic Press, 1997. p. A5-A8.
- WOINET, B., ANDRIEU, J., LAURENT, M., MIN, S.G. Experimental and theoretical study of model food freezing. Part II. Characterization and modeling of the ice crystal size. *Journal of Food Engineering*, London, v.35, p.395-407, 1998.
- YOON, K.S., LEE, C.M. Cryoprotectant effects in surimi and surimi/mince-based extruded products. *Journal Food Science*, Chicago, v.55, n.5, p.1210-1216, Sept./Out. 1990.
- ZARITZKY, N.E. Preservación III: congelación de alimentos. In: \_\_\_\_ temas en tecnología de alimentos. Buenos Aires: CYTED, 1997. cap.4, p.131-186.
- ZASYPKIN, D.V., LEE, T.C. Extracellular ice nucleators from *Pantoea Ananas*: Effects on freezing of model foods. *Journal Food Science*, Chicago, v.64, n.3, p.473-478, 1999.