

ESTRUTURAÇÃO DE CRISTAIS DE GELO EM SOLUÇÕES AQUOSAS CONTENDO SOLUTOS DIVERSOS¹

CLÉCIA SILVA CARNEIRO² e JOSÉ CAL-VIDAL³

RESUMO - Existe uma grande demanda de conhecimentos na área de criopreservação de frutos tropicais com vistas a reduzir os danos celulares provocados por cristais de gelo durante o congelamento. O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de estruturação de cristais de gelo. Soluções aquosas contendo arabinose, glicose, piridoxina, creatina, metionina, lisina e arginina, foram submetidas a congelamento lento em ar estático e as amostras resultantes examinadas por microscopia ótica sob luz polarizada. Os açúcares arabinose e glicose provocaram nos cristais de gelo estruturas que variaram de uma configuração hexagonal a uma arbórea, dentre outras. Vitaminas hidrossolúveis e compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos favoreceram a formação de arranjos circulares filamentosos.

Termos para indexação: criopreservação, dano celular.

ICE CRYSTALS STRUCTURING IN WATER SOLUTIONS CONTAINING DIFFERENT SOLUTES

ABSTRACT - There is a great demand for information about the cryopreservation of tropical fruits to reduce cell damage caused by ice crystals during freezing. The objective of this work was to study the structuring capacity of ice crystals. Water solutions having arabinose, glucose, pyridoxine, creatine, methionine, lysine and arginine were submitted to a slow freezing process and the resulting samples were examined under an optical microscope under polarized light. Sugars (arabinose and glucose) caused a range of structures, from hexagonal to tree-like configurations, among others. Water soluble vitamins and hydrophilic or hydrophobic compounds favored the formation of needles arranged in a circular-type manner.

Index terms: cryopreservation, cell damage.

INTRODUÇÃO

Há dois mecanismos que podem promover o dano à estrutura celular e conduzir diretamente à diminuição da firmeza do tecido vegetal. O primeiro está relacionado com a possibilidade de perfuração da membrana celular pelo cristal de gelo intracelular, que contribui para a redução da pressão de turgor. O segundo se relaciona com a quebra da estrutura da parede celular pelo cristal formado no meio extracelular, abrindo caminho para o colapso celular

(Spiess, 1980; Ashworth, 1990; Martí & Aguilera, 1991; Resende, 1995; Resende & Cal-Vidal, 1997; Carneiro & Cal-Vidal, 1998a e 1998b).

A morfologia de cristais de gelo tem sido estudada por alguns pesquisadores por meio do monitoramento da velocidade e tempo de congelamento (Reid, 1983; Shirai et al., 1985; Martí & Aguilera, 1991; Miyawaki et al., 1992; Fuchigami et al., 1994) ou por adição de substâncias ao sistema, conhecidas como crioprotetores, reduzindo a formação de gelo via depressão da atividade de d'água, prevenindo, deste modo, o dano às membranas, e minimizando a atividade enzimática e a deterioração texturométrica. Algumas destas substâncias agem pela retirada d'água por osmose, promovendo a formação de soluções muito concentradas dentro das células.

¹ Aceito para publicação em 11 de março de 1999.

² Eng. Alimentos, M.Sc., Dep. Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-000 Lavras, MG.

³ Eng. Químico, Dr., UFLA. E-mail: calvidal@ufla.br

É importante notar que certos materiais dissolvidos reduzem consideravelmente a taxa de crescimento dos cristais de gelo, e que materiais orgânicos podem ter maior efeito. Isto se deve à velocidade com que as moléculas podem difundir-se até a superfície do gelo. Solutos presentes na água também podem influenciar diretamente a morfologia dos cristais de gelo. Esses efeitos são particularmente importantes no congelamento de materiais alimentares (Fennema, 1982; Muhr & Blanshard, 1986; Thomas & Smith, 1994; Resende, 1995; Resende & Cal-Vidal, 1997).

Açúcares que ciclizam como hexoses e têm cinco carbonos ligados com uma hidroxila permitem cinco ligações com o gelo, formando estruturas hexagonais, atingindo, assim, maior estabilidade (Warner, 1981). Durante o congelamento da solução, a fase não congelada muda significativamente as propriedades físico-químicas, tensão superficial e interfacial. Além disso, a estrutura da água e interações soluto-água podem ser drasticamente alteradas e as macromoléculas podem ser forçadas a unirem-se em interações mais prováveis (Echlin, 1992). Os grupos hidrofóbicos de substâncias adicionadas interagem fracamente com a água adjacente, preferindo um ambiente não aquoso. A água adjacente aos grupos hidrofóbicos assume maior grau de estruturação do que o observado na água pura, resultado de uma mudança termodinâmica não favorável com o decréscimo da entropia. Para minimizar esta ocorrência, os grupos hidrofóbicos tendem a agregar-se para minimizar seu contato com a água, num processo chamado interação hidrofóbica (Garrett & Grisham, 1995). De acordo com Lehninger (1970), muitos componentes celulares – em particular as proteínas, os ácidos nucléicos e os lipídeos polares – são anfipáticos e tendem a formar estruturas nas quais as partes hidrofóbicas não polares são escondidas da água.

Koster & Lynch (1992) tentaram determinar a distribuição de açúcares solúveis em vacúolos e citoplasma de protoplastos aclimatados ao frio. Quantidades de açúcar solúvel estavam presentes fora dos vacúolos, o que sugere uma possibilidade de crioproteção. Shirai et al. (1985) observaram a formação de cristais de gelo em forma de discos em soluções aquosas contendo dextrana. Os cristais apresentaram superfície fina e transparente, com uma

propagação radial de pequenos cristais em formas arredondadas com áreas vazias inter-localizadas. Determinações físicas foram realizadas para caracterizar os cristais formados. O efeito de substâncias poliméricas no crescimento dos cristais de gelo foi avaliado por Shirai et al. (1985). A taxa de nucleação foi significativamente diminuída em soluções poliméricas, e novos estudos envolvendo o uso de soluções mistas de lactose e dextrana revelaram um efeito sinérgico da lactose quando utilizada em combinação com compostos de alto peso molecular. Hartel & Chung (1993) investigaram o efeito de proteínas de soro lácteo na superfície do cristal de gelo e observaram uma alteração da estrutura da camada absorvida, bem como mudanças visíveis na própria estrutura superficial do cristal. As proteínas parecem afetar a velocidade de crescimento dos cristais e sua estrutura superficial. Pesquisas mais recentes (Hon et al., 1995) descobriram que as chamadas proteínas-anticongelantes (AFPs) conseguem estabelecer ligações com o gelo graças à existência de terminais polares de aminoácidos que se alinham, de modo a permitir interações estáveis com a grade cristalina. Estudos adicionais vêm sendo realizados em plantas aclimatadas ao frio (Hon et al., 1995), tentando estabelecer diversas categorias de proteínas que conseguem inibir o crescimento dos cristais de gelo.

O presente trabalho objetivou estudar a capacidade de estruturação e a morfologia de cristais de gelo sob a influência de substâncias com natureza química diversa.

MATERIAL E MÉTODOS

Soluções-modelo de arabinose, glicose, piridoxina, creatina, metionina, arginina, e lisina foram utilizadas nas concentrações listadas abaixo (Tabela 1). Utilizaram-se placas de Petri de 2,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura para o congelamento de soluções em congelador comercial, operando a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ com um tempo médio de 24 minutos, para atingir a temperatura de equilíbrio. O resfriamento das amostras foi verificado através de termopares Cobre-Constantan (Digitron Instrumentation, Inglaterra) acoplados a um registrador de temperatura (SP25K Dataprinter), e um dos termopares foi colocado em contato com a amostra, e o outro, no ambiente do congelador. O experimento foi conduzido em triplicata. As amostras

TABELA 1. Substâncias empregadas nas soluções submetidas a congelamento.

Substâncias	Concentrações (g/100 g de água)				
	5	10	15	20	30
D-glicose	5	10	15	20	30
D-arabinose	5	10	15	20	30
Cloridrato de piridoxina (C ₈ H ₁₂ ClNO ₃)	1	5	15		
Creatina monohidratada (C ₄ H ₉ N ₃ O ₂ .H ₂ O)	1	3	5		
DL-metionina (CH ₃ SCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH)	1	3	5		
L(+)-monocloridrato de lisina (C ₆ H ₁₅ ClN ₂ O ₂)	1	3	5		
L(+)-arginina (C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)	1	3	5		

submetidas ao congelamento lento (ar estático) foram observadas ao microscópio ótico de contraste de fase (Nikon optiphot phase contrast 1.25), munido de um sistema de câmera automática (Nikon FX-35A), e um filtro de polarização. As fotos foram produzidas com uma magnificação de 4x e copiadas no tamanho de 10x15 cm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de açúcares sobre a estruturação de cristais de gelo

Soluções-controle (sem adição de substâncias estruturantes) quando submetidas a congelamento promovem a formação de cristais arredondados do tipo apresentado na Fig. 1.

A presença de glicose a 5% provocou a estruturação da água na forma hexagonal (Fig. 2). A morfologia dos cristais de gelo pareceu depender da estabilidade da conformação que estes assumiram em cada tratamento. A glicose, por ser uma hexose, conferiu ao gelo maior estabilidade conformacional-hexagonal (Warner, 1981). Uma estrutura com forma arbórea caracterizou o efeito da arabinose a 20 e 30%. Moléculas d'água pareciam estar fisicamente impedidas de migrarem até determinados núcleos para formarem cristais de água, e se fixavam ao longo das macromoléculas do soluto. Uma proporção considerável das moléculas d'água, todavia, preencheu os espaços intersticiais da estrutura arbórea, constituídos essencialmente de

água pura acomodada coplanarmente, como equacionada anteriormente por Woinet et al. (1997). Ratificando o fato de as moléculas d'água assumirem nos cristais de gelo a morfologia do açúcar do soluto, demonstrou-se tal efeito no tratamento correspondente às soluções contendo 20% de arabinose (Fig. 3A), onde foi observada a formação de cristais longos e alargados, com grande semelhança aos observados no açúcar cristalino em questão. Na Fig. 3B é mostrado um núcleo da estrutura arbórea formada a partir de uma solução aquosa contendo 30% de arabinose. Neste caso, são facilmente visíveis as interseções das ramificações com o eixo principal da estrutura arbórea e a sobreposição destas estruturas. Um aumento na estruturação, e, conseqüentemente, uma morfologia mais definida, deveu-se ao aumento na concentração do açúcar.

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

A concentração de piridoxina a 15% (Fig. 4A) provocou um arranjo ou conglomerado circular de cristais de gelo e soluto. Cada molécula d'água pode ligar-se com até duas moléculas de piridoxina.

A Fig. 4B apresenta arranjos estruturais de cristais de gelo em soluções aquosas contendo creatina ao nível de 1%. Esta estruturação mostra a formação de cristais orientados a partir de núcleos bem definidos. Neste caso tem-se a incidência de filamentos mais finos do que os observados nas amostras de piridoxina. Interessante notar, ainda, que estes filamentos tendem a apresentar certo grau de arborização em suas extremidades. Esta característica pode constituir a solução técnica viável, que se procura, para reduzir danos celulares por cristais de gelo durante o congelamento; basta comprovar se este tipo de configuração também apresenta um grau de flexibilidade capaz de reduzir o dano celular físico-mecânico do tipo promovido pelas configurações cristalinas mais comuns (hexagonal e dendrítica). Tal configuração, se confirmadas as características, poderá oferecer a possibilidade de termos frutos congelados com maior estabilidade.

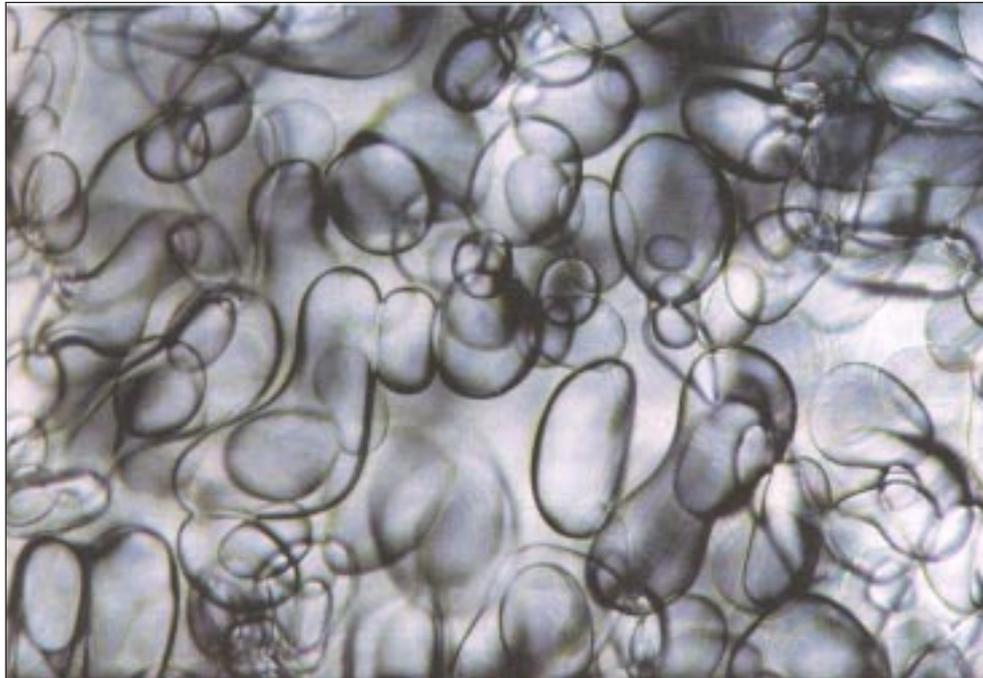


FIG. 1. Cristais de gelo obtidos em água pura ($\Delta T = 20^{\circ}\text{C}$).

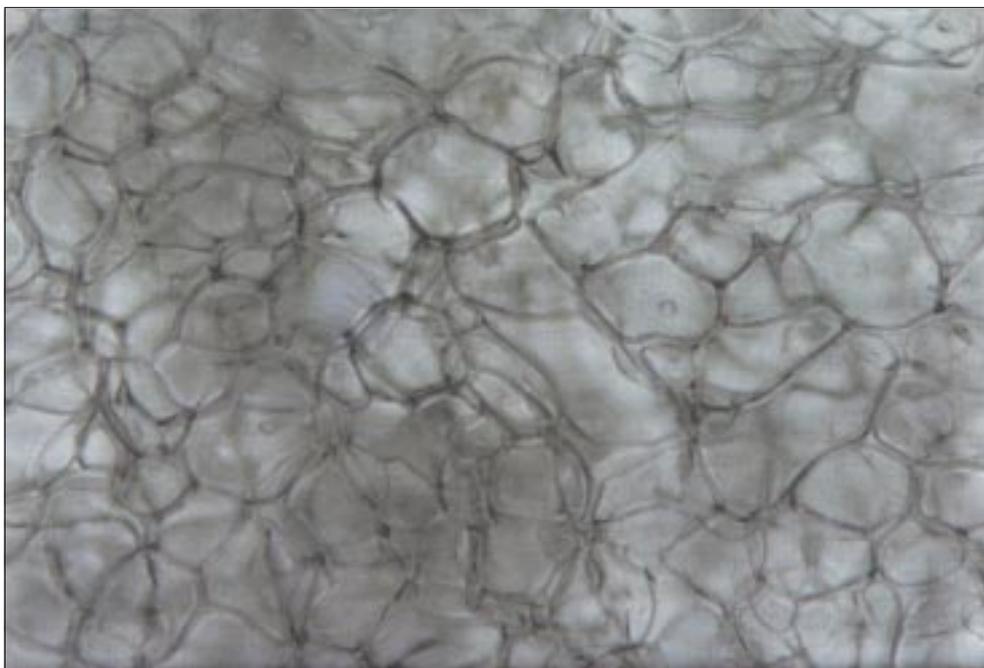


FIG. 2. Estrutura de cristais de gelo obtidos em soluções aquosas de glicose a 5%.

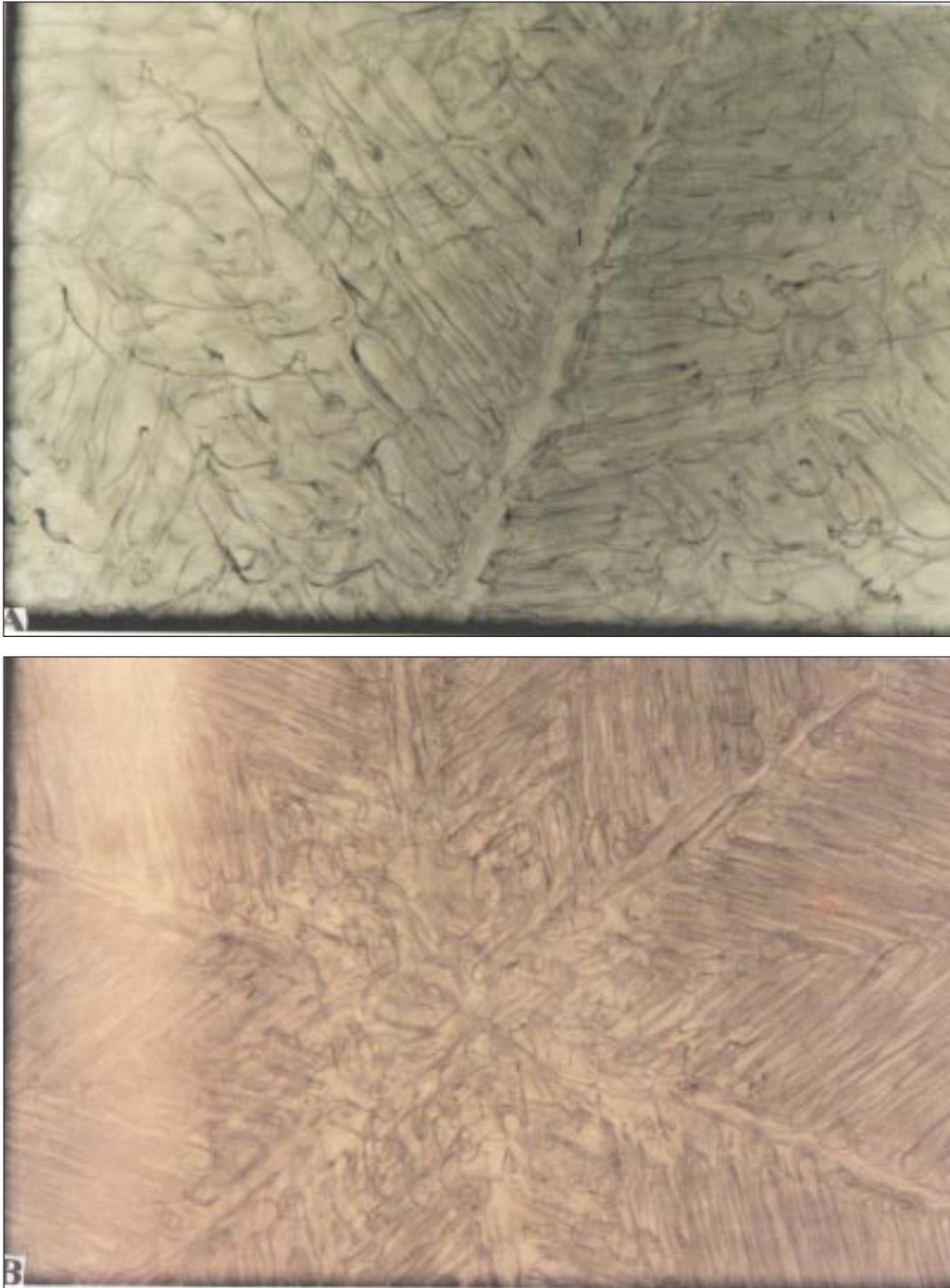


FIG. 3. Estruturas arbóreas de cristais de gelo em soluções aquosas contendo arabinose a 20% (A) e a 30% (B).

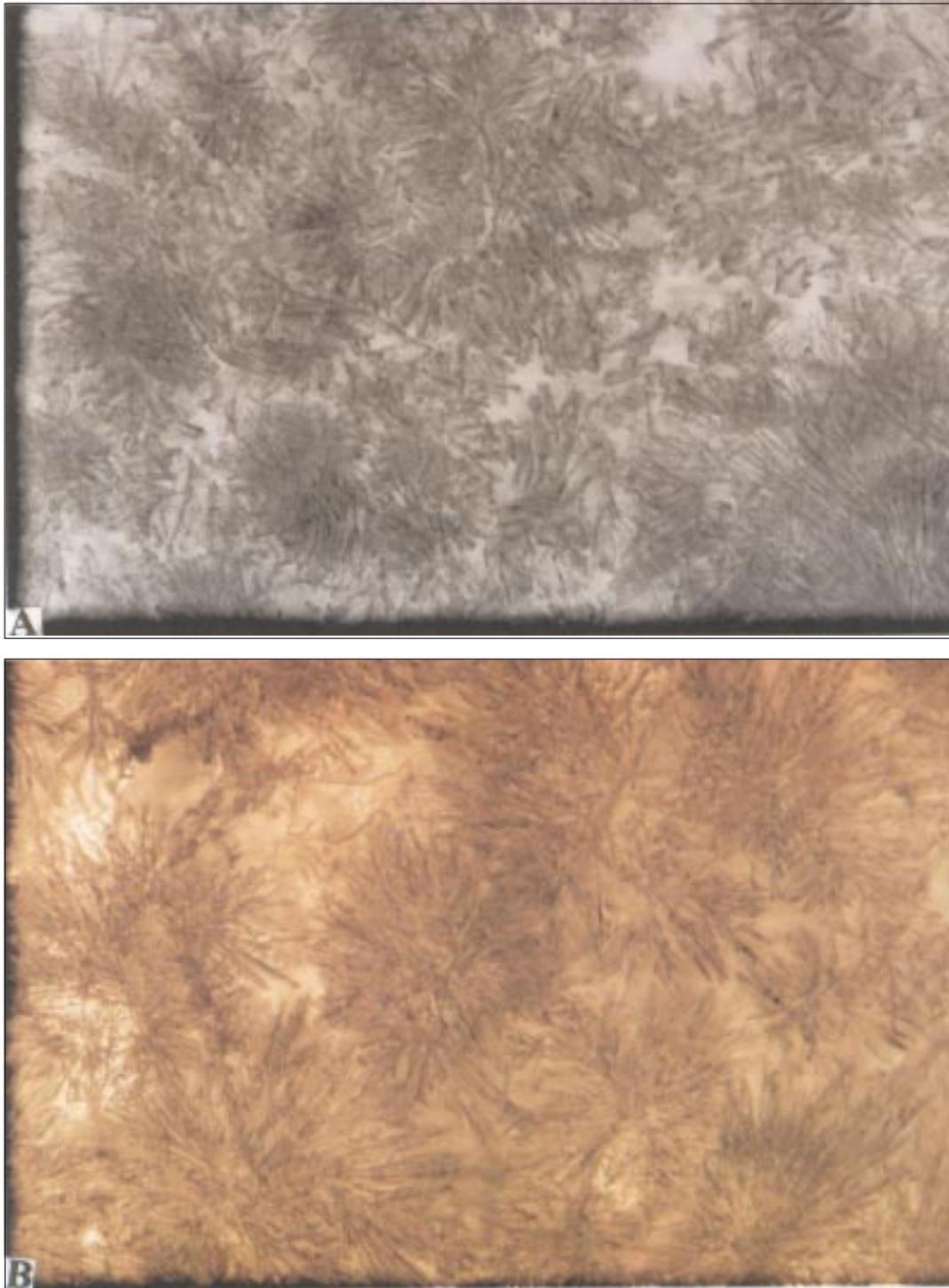


FIG. 4. Estruturação do gelo em soluções aquosas contendo piridoxina a 15% (A) e creatina a 1% (B).

As morfologias encontradas no congelamento das soluções contendo piridoxina e creatina parecem ser menos comuns, tendo em vista não ter sido encontrado algo semelhante nos trabalhos sob análise.

Estruturação do gelo na presença de aminoácidos

Na Fig. 5, mostra-se o arranjo estrutural do gelo sob a influência de metionina a 5%. Finas agulhas de metionina dão configuração aos cristais de gelo. Configurações angulosas parecem dispersas, a partir dos arranjos, e se difundem sobre a superfície do gelo. Isto deve-se ao fato de que a metionina é um aminoácido hidrofóbico e portanto não se liga diretamente com a água. As interações hidrofóbicas têm relativamente pouco direcionamento, em comparação com as pontes de hidrogênio, mas produzem um sistema de alta estabilidade (Garrett & Grisham, 1995).

A Fig. 6A mostra a formação de cristais de gelo em solução, contendo 1% de lisina, um pouco disformes, mas, em alguns casos, com tendência a arredondar. Os cristais apresentaram-se maiores do que os formados na presença de arginina. Isto talvez se deva ao fato de a lisina apresentar peso molecular mais baixo do que esta, dificultando menos a migração das moléculas d'água. A lisina, por ser um aminoácido carregado positivamente, interage com as moléculas d'água, estruturando o gelo.

Cristais de gelo formados em solução aquosa contendo 5% de arginina (Fig. 6B) apresentaram configuração hexagonal. A arginina é também um aminoácido carregado positivamente, e por esta razão interage com a água em uma conformação estável. A presença de cristais de arginina próximos à interface do gelo pode também ser observada.

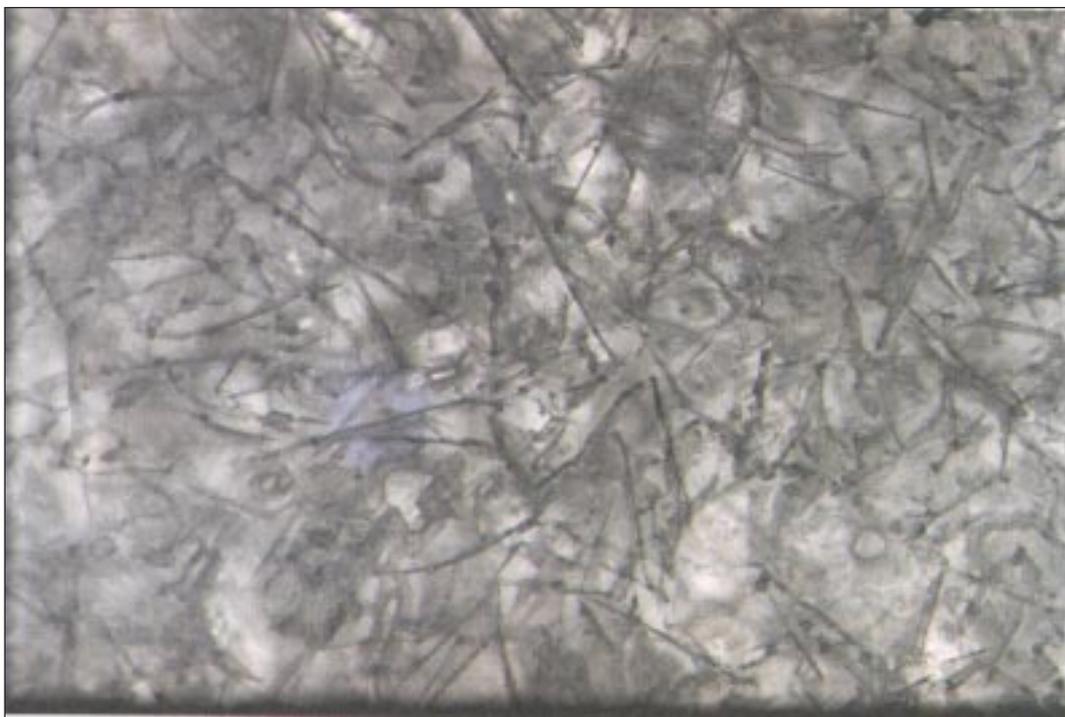


FIG. 5. Estruturação do gelo em soluções aquosas contendo metionina a 5%.

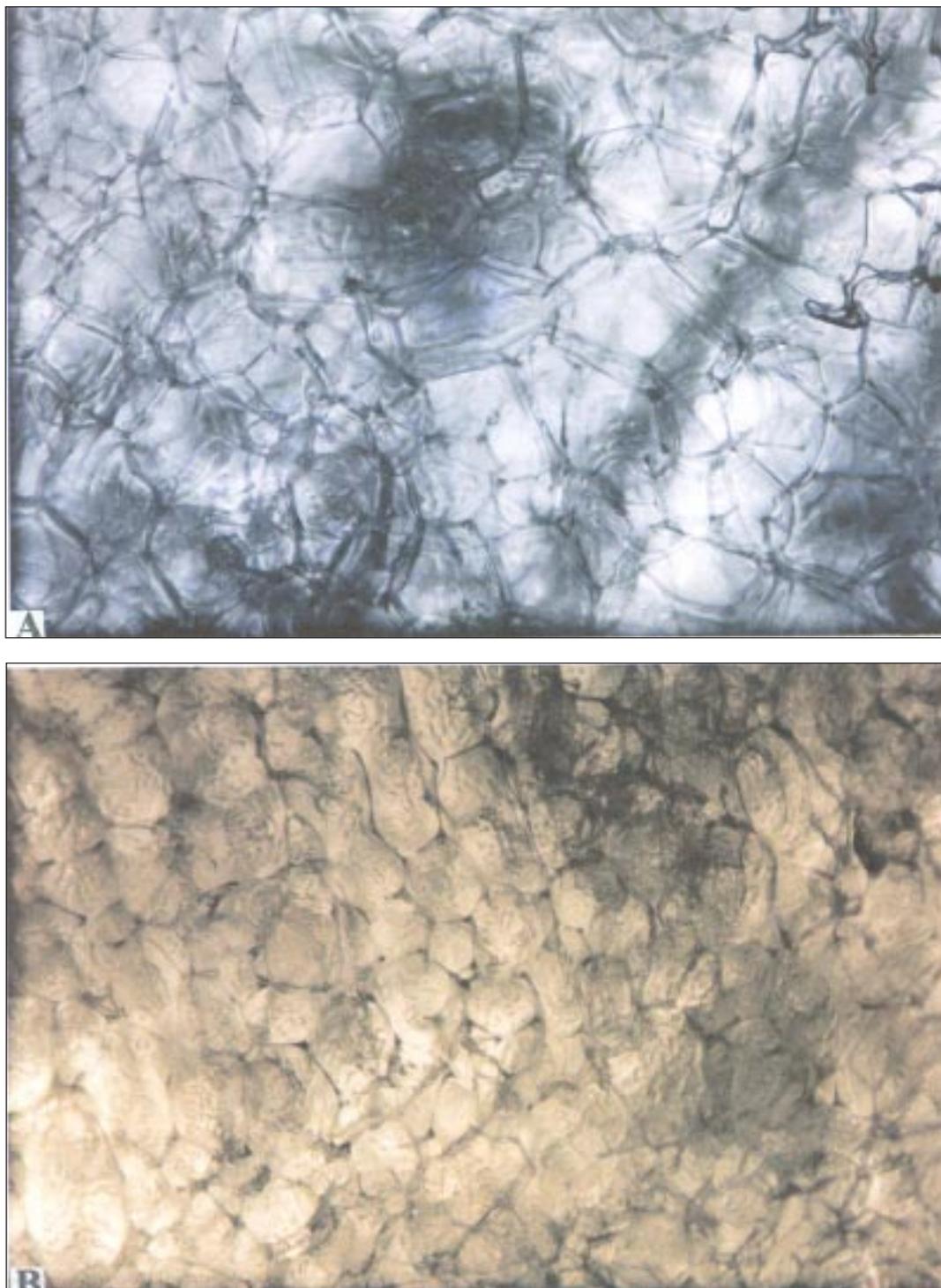


FIG. 6. Estruturação do gelo em soluções aquosas contendo lisina a 1% (A) e arginina a 5% (B).

CONCLUSÕES

1. A presença de glicose e arabinose nas soluções aquosas produz cristais de gelo com configurações hexagonais (5%) e arbóreas (20% e 30%), coincidentemente.

2. A presença de piridoxina (15%) e creatina (1%) em soluções aquosas, favorece a formação de conglomerados com arranjo circular, de aparência filamentosa delgada.

3. A estruturação hexagonal é característica das soluções com lisina e arginina.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro; ao Prof. Dr. J. Cruz Machado, da Universidade Federal de Lavras, pela colaboração na realização do trabalho experimental.

REFERÊNCIAS

- 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.
- CARNEIRO, C.S.; CAL-VIDAL, J. Ice crystal structuring as affected by amphiphilic substances. **The Journal of Scanning Microscopies**, Mahwah, 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 WATER MANAGEMENT IN THE DESIGN AND DISTRIBUTION OF QUALITY FOODS, 7., 1998, Helsinki, Finland. **Proceedings**. Helsinki: University of Helsinki, 1998b. p.1-4.
- ECHLIN, P. **Low-Temperature Microscopy and Analysis**. New York : Plenum, 1992. 539p.
- FENNEMA, O.R. Water and ice. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food chemistry**. New York : Marnel Dekker, 1982. p.23-67.
- FUCHIGAMI, M.; MIYAZAKI, K.; HYAKUMOTO, N.; NOMURA, T.; SASAKI, J. Texture and histological structure of carrots frozen at a programmed rate and thawed in an electrostatic field. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.6, p.1162-1168, Nov./Dez. 1994.
- GARRETT, R.H.; GRISHAM, C.M. **Biochemistry**. Londres : Saunders College, 1995. 1100p.
- 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.
- 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.
- 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.
- LEHNINGER, A.L. **Biochemistry**. New York : Worth Publishers Inc., 1970. 1053p.
- MARTÍ, J.; AGUILERA, J.M. Efecto de la velocidad de congelación en las características mecánicas y microestructurales del arándano y de la mora silvestre. **Revista Agroquímica Tecnológica Alimentar**, Valencia, v.31, n.4, p.493-504, abr. 1991.
- 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.
- MUHR, A.H.; BLANSHARD, J.M.V. Effect of polysaccharide stabilizers on the rate of growth of ice. **Journal of Food Technology**, Oxford, v.21, n.3, p.683-710, May/June 1986.
- REID, D.S. Fundamental physicochemical aspects of freezing. **Food Technology**, Chicago, v.37, n.4, p.110-115, Apr. 1983.
- RESENDE, J.V. **Redução de danos de congelamento em frutos de melão utilizando substâncias crioprotetoras de concentrações e origens diversas**. Lavras : Universidade Federal de Lavras, 1995. 136p. Dissertação de Mestrado.
- 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, 1997. p.SA1-SA4.

- SHIRAI, Y.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, K. Effects of polymers on secondary nucleation of ice crystals. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.2, p.401-406, Mar./Abr. 1985.
- SPIESS, W.E.L. Impact of freezing rates on product quality of deep-frozen foods. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING, 2., AND FOOD AND THE EUROPEAN FOOD SYMPOSIUM, 8., 1980, Helsinki: **Proceedings**. Helsinki : Elsevier Science Publishers, 1980. p.689-694.
- 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.
- WARNER, D.T. Theoretical studies of water in carbohydrates and proteins. In: STEWART, G.F.; ROCKLAND, L. (Eds.). **Water activity: Influences on food quality**. New York : Academic, 1981. p.435-465.
- 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, 1997. p.A5-A8.