

Análise da mobilidade molecular em matrizes sólidas utilizando conceitos de ciências de biomateriais: aplicação na optimização da qualidade de produtos congelados

Jorge C. Oliveira *, Isabel B. Cruz, Pedro M. Pereira e Jesus M. Frias

Escola Superior de Biotecnologia
Universidade Católica Portuguesa
Porto

* Fax: 02-590351.

E-mail: jorge@esb.ucp.pt

Sumário

O estudo de matrizes sólidas bioquímicas utilizando as noções de transição de estado vítreo desenvolvidas na ciência dos materiais (poliméricos) é um assunto que tem recebido crescente atenção na biotecnologia e ciência e engenharia de processos alimentares, sobretudo pela sua aplicação na melhoria de produtos desidratados, congelados, preparações enzimáticas e culturas celulares. Esta comunicação apresenta uma revisão sucinta destes conceitos, aplicados em particular à optimização da qualidade de alimentos congelados. Esta teoria permite desenvolver linhas de investigação sobre alteração da formulação dos produtos no sentido de aumentar a sua capacidade de manter a qualidade obtida no processo de congelação durante o armazenamento e distribuição.

1. Introdução

Em todos os sistemas de interesse na biotecnologia (enzimáticos, microbianos) e em particular em alimentos, a água desempenha vários papéis essenciais, pelo que a sua mobilidade dentro do sistema é um assunto da maior importância.

Convencionalmente, a água é dividida em duas grandes classes - água livre e água ligada à estrutura.

Dado que a ligação à estrutura terá diferente intensidade consoante o tipo de ligação (adsorção física, pontes de hidrogénio, ligações polares, ligações covalentes, etc.), alguma da água ligada poderia de facto ser utilizável. Admitindo que a facilidade de quebra das ligações para utilização de moléculas de água em metabolismos enzimáticos ou celulares seria a mesma que a capacidade de remoção de água por ar abaixo do seu ponto de saturação, poder-se-ia quantificar a disponibilidade de água numa matriz através da actividade da água (a_w). No seu conceito termodinâmico, a actividade da água é simplesmente igual à humidade relativa do ar que está em equilíbrio com a matriz sólida em termos de troca de água, considerando o ar como um sistema ideal. Assim, uma matriz com uma actividade de água de, por exemplo, 0.8 contém moléculas de água tão fortemente ligadas à estrutura que ar com humidade relativa de 80% está em equilíbrio com essa matriz (Karel, 1975).

Ao longo de muitas décadas, este conceito foi suficiente para descrever a estabilidade de alimentos, correlacionando-se relativamente bem a velocidade de crescimento de micro-organismos, de actividade enzimática e de reacções degradativas não-enzimáticas, com a_w . No entanto, veio a revelar-se insuficiente para descrever certas

situações, sendo questionada em particular por estudos de crescimento microbiano em diferentes soluções, onde se verifica que em soluções com o mesmo valor de a_w e de outros factores relevantes (pH, concentração de nutrientes, ausência de interferentes) há por vezes velocidades de crescimento microbiano muito diferentes (Slade and Levine, 1991). No final da década de 80 começaram a multiplicar-se sugestões em literatura e congressos internacionais para complementar o conceito de a_w com uma forma diferente de quantificar a mobilidade das moléculas de água numa matriz, baseada na teoria de transição de estado vítreo, transposta da área da ciência dos materiais. A primeira sugestão data já de 1966 (White and Cakebread, 1966), mas foi sobretudo no início da presente década que esta abordagem começou a ser utilizada em maior profundidade (Slade e Levine, 1991), sobretudo graças ao trabalho de Slade e Levine, que publicaram em 1986 a primeira comunicação marcante da sua longa série (Slade e Levine, 1986). Variadíssimas aplicações na área alimentar podem ser consultadas em Blanshard e Lillford (1993).

Nesta comunicação é feita uma pequena revisão dos conceitos teóricos mais importantes relativamente a transição de estado vítreo e mudanças de fase em sistemas bioquímicos, analisando a aplicação destes conceitos a alimentos congelados.

2. Conceitos teóricos

2.1. Transição de estado vítreo (T_g)

A maior parte das moléculas que constituem alimentos (e outros sistemas bioquímicos e microbianos de interesse na biotecnologia) podem agrupar-se numa estrutura amorfa ou cristalina.

Em geral, uma estrutura cristalina é altamente organizada e envolve essencialmente ligações entre moléculas do constituinte, ou seja, tem um elevado grau de pureza. O elevado grau de estruturação implica que a entropia da matriz é mínima e relativamente pouco afectada pela temperatura. Podem existir diferentes tipos de estruturas, consoante as ligações e sua orientação, havendo portanto estruturas cristalinas com menor entropia que outras. Estas estruturas são muito rígidas e estáveis, havendo uma tendência das formas cristalinas de entropia mais elevada evoluírem para as de menor entropia. Macromoléculas complexas podem ter partes cristalinas e outras amorfas. O caso mais típico é o da molécula de amido, que na sua forma nativa apresenta as cadeias ramificadas de amilopectina (parcialmente) cristalinas e as partes lineares de amilose amorfas. Estas estruturas são designadas semi-cristalinas.

Uma estrutura amorfa tem um grau de organização muito mais baixo, isto é, uma entropia muito superior, e é constituída não só por moléculas do composto como por outras, que podem mesmo funcionar como elementos de ligação entre diferentes moléculas do composto em causa. De entre as "impurezas" que podem ser "apanhadas" numa estrutura amorfa destacam-se as moléculas de água. Estas estruturas são tipicamente mais flexíveis que as cristalinas e a sua entropia depende fortemente da temperatura.

Quando um composto solidifica, baixando-se a sua temperatura de um ponto no estado líquido para abaixo

da temperatura de solidificação, normalmente formar-se-á uma estrutura amorfa ou cristalina dependendo da rapidez do arrefecimento. Se o arrefecimento for lento, existe "tempo" para que as moléculas se ordenem e formem uma estrutura cristalina, enquanto que se o arrefecimento for muito rápido se forma uma estrutura amorfa. Dado que a estrutura amorfa tem um nível de entropia superior, o sistema tenderá naturalmente para cristalizar com o tempo, processo que poderá demorar entre alguns segundos a milhares de anos, dependendo de vários factores, dos quais a mobilidade da água é um dos mais importantes. Em relação à água, este processo não se verifica em condições normais; a molécula de água é muito pequena e facilmente cristaliza, pelo que o arrefecimento de água pura abaixo de 0 °C conduz a água sólida na fase cristalina (gelo), qualquer que seja a taxa de arrefecimento. É possível formar uma estrutura amorfa de água, mas apenas a pressões muito elevadas e a estrutura cristaliza quase instantaneamente se a pressão ambiente for reposta.

Se considerarmos uma estrutura amorfa criada por um arrefecimento rápido e continuarmos a arrefecer, a entropia baixa progressivamente como toda a energia interna do sistema. Extrapolando, é evidente que se a mesma estrutura se mantivesse a entropia viria a ser eventualmente inferior à de estruturas cristalinas, o que é fisicamente impossível. É óbvio que tem de haver um limite físico para o decréscimo de

energia interna dum estrutura amorfa com a temperatura, isto é, tem de ocorrer uma mudança de fase, que será necessariamente correspondente a um nível de entropia superior ao de estruturas cristalinas, em que a estrutura amorfa altera as suas propriedades, passando de uma estrutura flexível e com alguma mobilidade para uma estrutura rígida e pouco sensível à temperatura (características semelhantes às de uma estrutura cristalina). A estrutura entre a solidificação e esta transição designa-se de "rubbery state" (estado flexível) e a estrutura abaixo deste ponto designa-se "glassy state" (estado vítreo), sendo a transição conhecida por "glassy state transition" (transição de estado vítreo). Há várias teorias para interpretar esta mudança de fase (Mansfield, 1993), sendo as mais importantes a teoria dos volumes livres, segundo a qual a transição para estado vítreo se dá quando o volume livre molecular se aproxima de zero (Doolittle, 1951) e os modelos entrópicos, que explicam teoricamente o motivo desta transição ser de 2ª ordem (Gibbs and DiMarzio, 1958).

Mudanças de fase de 2ª ordem segundo a classificação de Ehrenfest (1933) são transições em que não há descontinuidade no nível de energia (energia livre de Gibbs), mas sim das suas derivadas (como o calor específico), conforme esquematizado na figura 1. Isto implica que efectivamente a transição não se dá a uma temperatura bem definida (mesmo para um composto puro),

Entalpia,
Calor específico

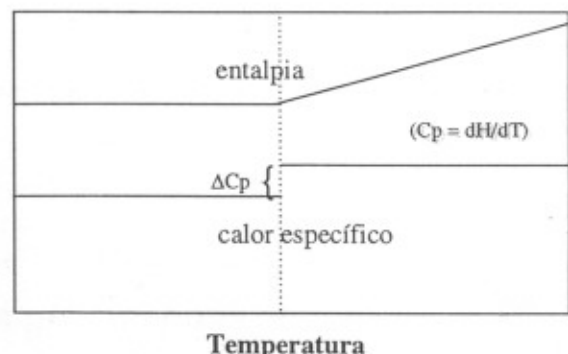


Figura 1. Esquema representativo de uma mudança de fase de 2ª ordem

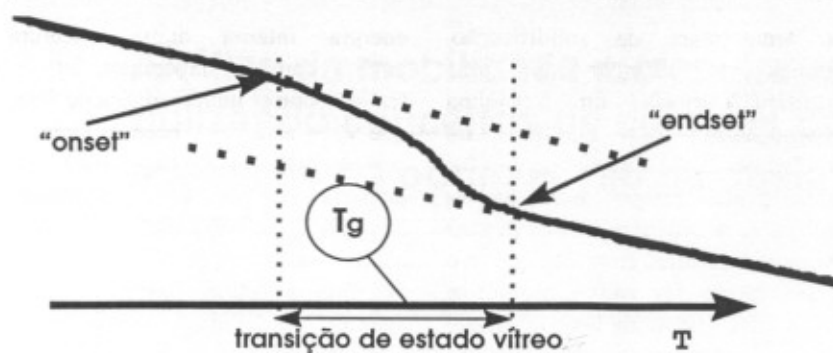


Figura 2. Esquema típico de um cromatograma de DSC de uma transição vítreo.

mas ao longo de uma gama de temperaturas de cerca de 10 a 30 °C (Slade e Levine, 1991; Roos, 1995). A figura 2 esquematiza um cromatograma típico de calorimetria de varrimento diferencial (DSC), que regista trocas de energia em função da temperatura e permite assim identificar os pontos em que mudanças de fase ocorrem. Embora esta mudança de fase ocorra numa gama de temperaturas, convencionalmente designa-se temperatura de estado vítreo (T_g) ao ponto intermédio num cromatograma de DSC.

2.2. Factores que afectam T_g

A composição da matriz sólida influencia fortemente o valor de T_g . A molécula com maior impacto em T_g é a água. A figura 3 mostra o

efeito do teor de água em T_g para diferentes compostos puros (Roos, 1995; Kokini *et al*, 1994). O decréscimo significativo de T_g com o aumento do teor de água designa-se por efeito plastificante. O abaixamento de T_g é importante no processamento de plásticos, dado que aumenta a processabilidade do polímero e daí a origem do nome. Como a água está presente em praticamente todas as estruturas bioquímicas, é por vezes designada como plastificante intrínseco. Outros compostos (diluente) apresentam também o mesmo tipo de efeito, sendo tradicional na indústria de polímeros a adição de poli-álcoois como plastificantes extrínsecos, dos quais o glicerol é o mais comum.

Outro factor muito importante é a dimensão das cadeias moleculares. Em geral, T_g aumenta com o aumento

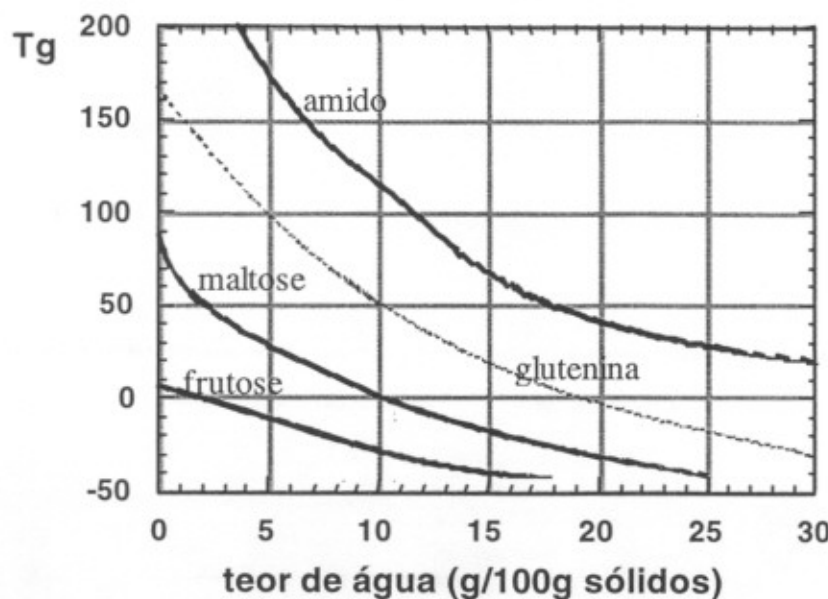


Figura 3. Influência do teor de água em T_g para amido, glutenina, maltose e frutose (correlação de dados experimentais apresentados por Roos, 1995 e Kokini *et al*, 1994)

do peso molecular médio da estrutura (Roos, 1995). A adição de macromoléculas (como polissacáridos) é um dos principais meios de aumentar T_g .

Em geral, qualquer efeito conhecido em abordagens mais convencionais como causando um aumento da capacidade de retenção de água (WHC - "water holding capacity") aumenta T_g , o que é evidente dado que diminui a quantidade de moléculas de água com capacidade para plastificar a estrutura. Do mesmo modo, é lógico que uma estrutura com compostos em fase amorfa (por exemplo, açúcares) tem um T_g significativamente mais elevado do que a mesma estrutura em que esses compostos estejam na sua forma cristalina.

É portanto possível alterar a formulação de uma matriz de modo a alterar o valor de T_g no sentido que for mais adequado. Para isso deve-se considerar o efeito dos vários componentes e de possíveis aditivos, com adequado conhecimento do efeito de polimorfismo nos componentes que apresentam essa capacidade, uma vez que cada forma tem potencialmente um efeito diferente no T_g de toda a estrutura. Esta dependência da conformação molecular faz com que factores intrínsecos ou extrínsecos que possam afectar estas conformações, como o pH, influenciem também T_g .

2.3. Determinação experimental de T_g

O método mais utilizado para determinar T_g é a calorimetria de varrimento diferencial (DSC), cujos resultados são consequentemente considerados como um padrão de referência. No entanto, existem várias outras alternativas, sendo de destacar em particular aquelas que se relacionam com medições da vibração ou mobilidade molecular, como ressonância nuclear magnética (NMR) e ressonância de "spin" electrónico (ESR), que permitem obter informação extremamente

valiosa para a compreensão mais profunda do fenómeno, embora o seu custo os torne menos usuais. Outros métodos comuns baseiam-se em alterações de propriedades físicas, como dilatométria (actualmente em desuso), análise termo-mecânica (TMA), análise térmica dielétrica (DETA) e análise termo-mecânica dinâmica (DMTA). Pormenores sobre as várias técnicas são fornecidos por Roos (1995).

Os autores têm aplicado e desenvolvido essencialmente a análise DMTA, que tem a característica interessante de permitir medir, em teoria, o tempo médio de relaxação molecular, através da ressonância entre a frequência de vibração molecular e a frequência da análise. A figura 4 mostra diagramas típicos de DMTA. As 3 respostas medidas em função da temperatura são os parâmetros visco-elásticos do

material, medidos por compressão: E' (módulo de armazenamento, que quantifica as trocas de energia reversíveis), E'' (módulo de perda, que quantifica a energia dissipada) e δ (ângulo de desfazamento, igual à razão entre E'' e E'). Estes módulos correspondem aos valores da função de transferência no domínio de resposta frequência, típicos de análises dinâmicas (Luyben, 1990). O ponto em que E' começa a decrescer é tomado como início da transição de fase ("on-set", Roos, 1995), o máximo de E'' é o ponto de ressonância com a vibração molecular (Allen, 1993), que à frequência de cerca de 1 Hz se correlaciona bem com T_g' determinado por DSC (MacInnes, 1993) e o máximo de δ é considerado o final da transição de estado ("off-set" ou T_m'). O valor de T_g depende da frequência de medição, o que é evidente do facto

de ser medido como um ponto de ressonância. A medição por DMTA também implica o fornecimento de energia mecânica na realização dos ciclos de compressão. No entanto, determinamos experimentalmente o valor da energia mecânica fornecida ao sistema em análises de farinhas e verificamos que era desprezável face ao fornecimento de energia térmica. A figura 5 mostra uma variação típica de T_g' com a frequência, obtida para uma solução quaternária com 30% de sólidos, constituída em partes iguais por lactose, frutose e glucose, ajustada a um modelo de Arrhenius, que normalmente se correlaciona bem com a variação de T_g com a frequência (MacInnes, 1993).

2.4. Transição de estado vítreo abaixo do ponto de congelação (T_g' , T_m' e T_c)

A maioria dos alimentos e matrizes de interesse para a biotecnologia contêm elevadas quantidades de água, ou seja, têm valores de T_g muito abaixo da temperatura de congelação. Consequentemente, se baixarmos a temperatura procurando atingir T_g , teremos de considerar antes disso a congelação. A formação de cristais de gelo tem um efeito evidente muito importante no T_g da matriz, dado que corresponde a uma crio-concentração, isto é, o teor de água diminui à medida que moléculas de água vão passando para o estado sólido, na forma cristalina. Assim, tal como a temperatura de congelação decresce com a evolução da congelação, T_g aumenta. Daí resulta que inevitavelmente haverá um ponto em que a temperatura de congelação (T_c) iguala o T_g da matriz. Esse ponto corresponde à crio-concentração máxima possível para a matriz em causa, ou seja, a concentração a partir da qual não é mais possível formar cristais de gelo. Toda a água restante ficará ligada à estrutura vitrificada que se forma (corresponde portanto à água que não congela).

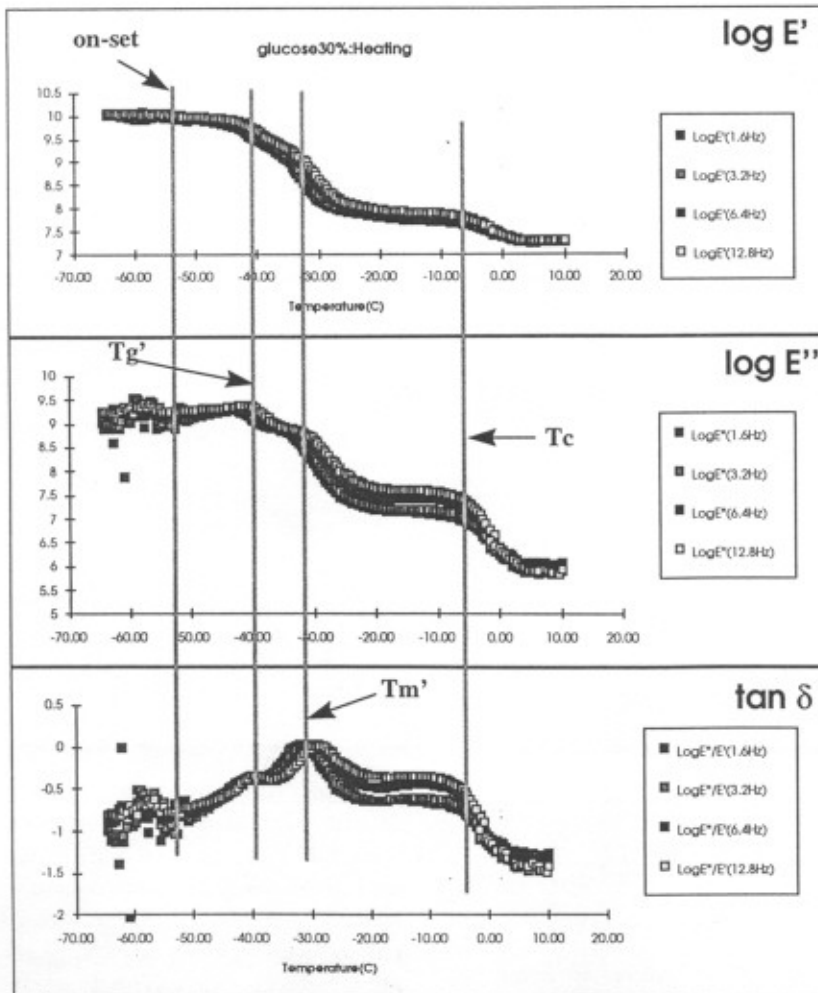


Figura 4. Diagramas de DMTA de uma solução com 30% de glucose a várias frequências.

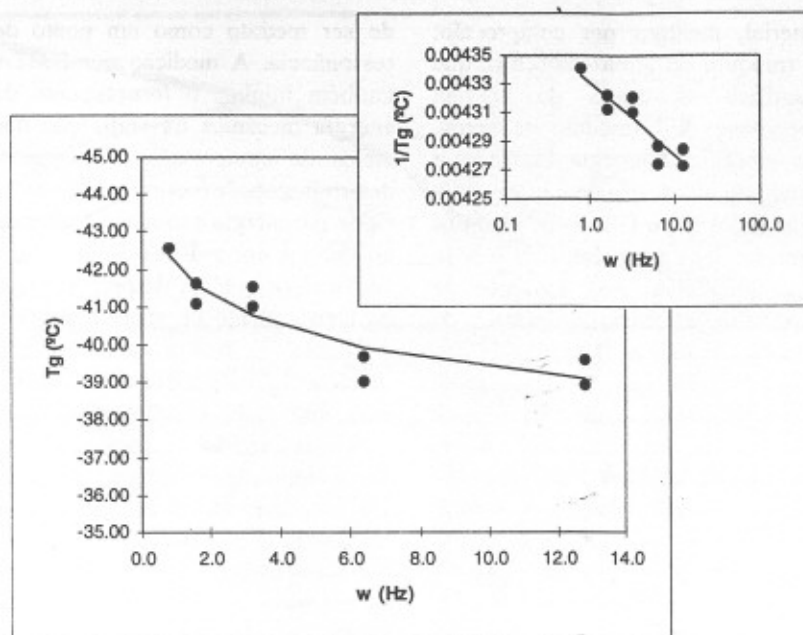


Figura 5. Variação de T_g' com a frequência de medição para uma solução de 30% de sólidos, contendo frutose, glucose e lactose em parte iguais. O gráfico mais pequeno mostra o ajuste de Arrhenius linearizado: $\omega = \omega_r \cdot \exp\left[-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_g} - \frac{1}{T_{gr}}\right)\right]$.

Esta evolução é esquematizada na figura 6, que representa um diagrama de fases. Se a congelação for lenta, poderá haver a formação de cristais de componentes que possam cristalizar (como açúcares ou lípidos), a partir do momento em que se atinja o seu ponto de solubilização. Se a congelação for rápida, precipitam formas amorfas. Dado que estas últimas contêm moléculas de água, ao contrário das

cristalinas, T_g aumentará mais significativamente neste caso. A temperatura em que T_c e T_g se igualam é designada por T_g' , ou seja, a temperatura de transição de estado vítreo da solução de crio-concentração máxima.

Roos e Karel (1991) e outros autores argumentam que a viscosidade máxima de uma solução para cristalização ou fusão de gelo é de cerca de 10^8 Pa.s. Dado que a

viscosidade de matrizes em estado vítreo é da ordem de 10^9 a 10^{12} Pa.s, haverá uma faixa de temperatura acima de T_g' na qual a formação de cristais de gelo já não é possível. Assim, define-se uma temperatura um pouco superior a T_g' , designada T_m' , a temperatura mínima de cristalização ou fusão de cristais de gelo (m do inglês "melting"), que é cerca de 5 a 8 °C superior a T_g (Roos, 1995). Esta noção está representada na figura 7, devendo-se notar que não é universalmente aceite. Slade e Levine (1991) recordam simplesmente que a transição de estado vítreo decorre numa gama de temperaturas e que T_g' é apenas o ponto intermédio, propondo que o valor designado por outros como T_m' seja apenas a indicação do fim da transição ("end-set"). Os autores gostariam de realçar que a cristalização ou fusão é uma mudança de fase de 1ª ordem, que em medições efectuadas com DMTA deveria ser independente da frequência da medição, enquanto que o "end-set" da transição de fase, por ser de 2ª ordem, deveria depender da frequência. Nos trabalhos experimentais que temos efectuado com soluções binárias, ternárias e quaternárias de açúcares temos verificado sempre uma dependência de T_m' com a frequência, o que sustenta portanto o ponto de vista de Slade e Levine.

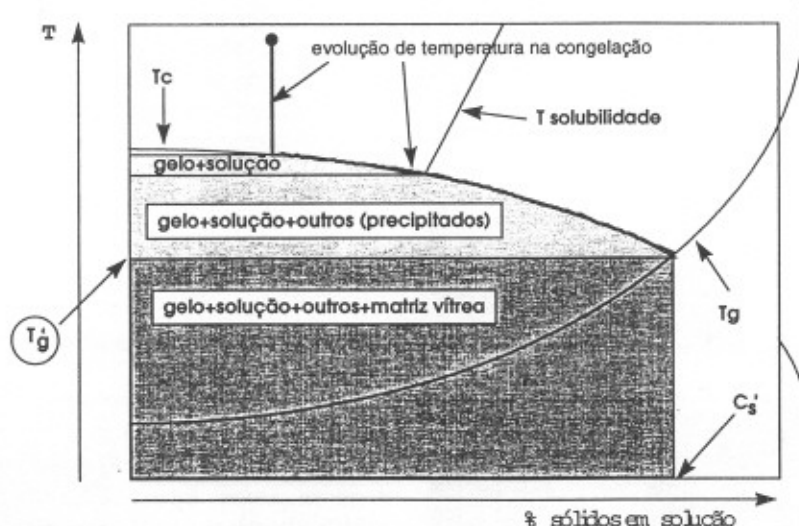


Figura 6. Esquema típico de um diagrama de fases de um produto ou solução a temperaturas inferiores à de congelação, assinalando a evolução de temperatura e concentração da solução (crio-concentração) durante o processo

3. Aplicação a alimentos congelados

3.1. Transição de estado vítreo e produtos congelados

Existem dois aspectos fundamentais a considerar na maioria dos produtos congelados: a sua qualidade sensorial, onde a textura assume um papel particularmente relevante e a segurança microbiológica. Em qualquer caso, é evidente que se os alimentos fossem armazenados abaixo de T_g' , em princípio o produto era praticamente estável, com tempo de vida de vários

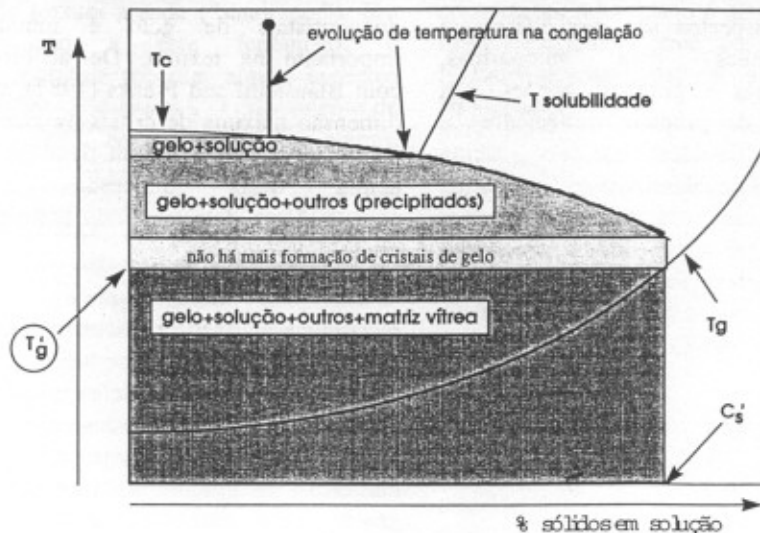


Figura 7. Esquema típico de um diagrama de fases semelhante ao da fig. 4, considerando T_m'

anos. No entanto, os alimentos têm um elevado teor de água, pelo que os seus T_g' são muito negativos. A figura 8 apresenta os valores de T_g' determinados por Levine e Slade (1989), podendo-se verificar que em geral são inferiores às temperaturas normais de sistemas de frio existentes (cerca de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, na melhor das hipóteses). Isto implica que os produtos congelados são armazenados e distribuídos acima de T_g' , isto é, com parte da estrutura a ser constituída por uma solução crioconcentrada não congelada e havendo um certo grau de mobilidade molecular. Nestas matrizes podem ocorrer vários fenómenos que deterioram a qualidade do produto: recristalização de cristais de gelo, cristalização de açúcares (amorfos) e coalescência de fase orgânica (ou seja, instabilidade de emulsões) - com implicações na textura; transformação de lípidos para as formas mais estáveis, oxidações enzimáticas e não-enzimáticas - com implicações quer sensoriais quer nutricionais; crescimento microbiano.

Uma conclusão interessante é a de que a qualidade superior produzida por processos criogénicos que permitem congelamentos mais rápidos é perdida durante o armazenamento, em maior ou menor extensão dependendo da mobilidade

na matriz e portanto da velocidade a que decorrem estes processos deteriorativos. Em geral, a mobilidade é tanto maior quanto maior a distância a T_g , conforme será descrito em maior detalhe seguidamente. Consequentemente, pretender-se-ia que um produto tivesse um T_g tão elevado quanto possível para que a sua estabilidade fosse óptima.

3.2. Complexidade das matrizes alimentares

As matrizes alimentares são, no

mínimo, misturas complexas de uma elevada diversidade de macromoléculas (por exemplo, leite e massas panares). A complexidade aumenta em certos casos, em que a matriz tem uma elevada estruturação (por exemplo, frutos e legumes) e a microestrutura celular influencia significativamente as características da matriz. Acresce a este facto que raramente as matrizes são estáveis; normalmente sofrem transformações contínuas como resultado de metabolismos naturais (por exemplo, processos de maturação ou senescência em tecidos vegetais).

Em termos gerais, pode-se considerar a influência dos principais tipos de componentes que afectam significativamente T_g , notando aqueles que podem apresentar diferentes conformações.

Nos carbo-hidratos considera-se três grandes classes: açúcares, polissacáridos e amido (que se isola dos restantes polissacáridos devido ao seu papel especial nos alimentos).

Os açúcares podem estar presentes em formas cristalinas ou amorfas e têm um certo efeito plastificante - substituir açúcares por outros com maior T_g ou por formas amorfas aumenta o T_g da matriz. Os seus T_g' são da ordem de $-50\text{ }^\circ\text{C}$ (pentoses) a $-25\text{ }^\circ\text{C}$ (dissacáridos e

- A - queijo fresco
- B - nata
- C - gelado
- D - leite magro
- E - leite homogeneizado
- F - natas batidas
- G - leite gordo
- H - maçã
- I - banana
- J - mirtilo
- K - pêssigo
- L - morango
- M - sumo de maçã
- N - sumo de limão
- O - sumo de laranja
- P - sumo de pêra
- Q - ananás
- R - sumo de ameixa
- S - sumo de morango
- T - sumo de uva
- U - bráculu
- V - couve flor
- W - batata
- X - espinafre
- Y - milho
- Z - tomate

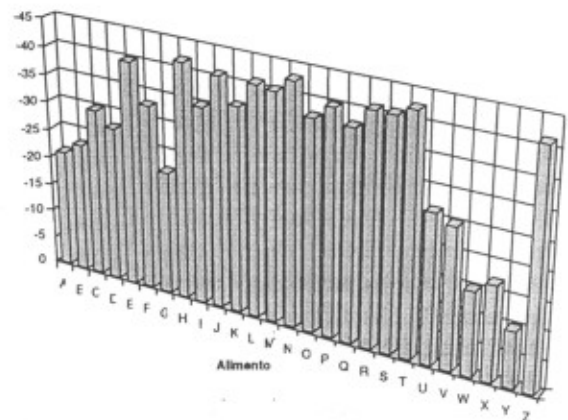


Figura 8. Valores de T_g' de diversos alimentos, de acordo com os dados obtidos por Slade e Levine (1991)

oligosacáridos), com cerca de -40°C para as hexoses (Slade and Levine, 1991). Os polissacáridos têm o efeito de aumentar T_g , em geral tanto mais quanto maior o seu peso molecular. O amido é um dos principais constituintes de alimentos, com uma estrutura muito complexa, cristalina, semi-cristalina ou amorfa. Alterar o tipo de amido (trigo, milho, batata, modificado) permite afectar o T_g da matriz quer pela sua conformação, quer pelo seu efeito estruturante, dado que a molécula de amido é um dos principais componentes estruturantes nos alimentos em que está presente. No entanto, o valor de T_g da maior parte dos amidos situa-se nos -7 a -5°C (Levine and Slade, 1989), pelo que o segundo efeito é muito mais importante. Consequentemente, a "escolha" de um amido deve ser feita com base no conhecimento das interações com os restantes componentes e do tipo de matriz formada, mais do que pelo seu T_g individual.

Em relação às proteínas, deve-se notar que estas podem ter uma importância maior que os polissacáridos como elementos estruturantes de bio-matrizes (Levine and Slade, 1990). Consequentemente, o seu efeito na estrutura da matriz é normalmente mais importante do que o seu T_g , tal como no caso do amido. As proteínas mais estudadas são as de cereais, sendo o seu T_g da ordem de -12 a -6°C (Slade *et al.*, 1988; Kokini *et al.*, 1994).

A terceira grande classe de constituintes de alimentos são os lípidos, sendo o polimorfismo o seu aspecto mais importante neste contexto. Os lípidos são em geral insolúveis e cristalizam com o arrefecimento. No caso mais importante dos triglicéridos, existem pelo menos 3 formas: α , β' e β , em ordem de estabilidade decrescente. A forma mais estável é no entanto indesejada do ponto de vista alimentar: os cristais α são normalmente demasiado grandes e desagradáveis à textura; a forma preferida para produtos como manteiga e margarina é a forma β' .

Estes aspectos são particularmente importantes para margarinas, manteigas e produtos gordos. Em termos de produtos congelados, o principal problema que ocorre acima de T_g' é a coalescência da fase gorda, o que em produtos como gelados pode ter um efeito sensorial indesejado (acumulação da fase orgânica no topo da embalagem e perda de textura da massa do gelado).

3.3. Fenómenos deteriorativos entre

$$T_g' / T_m' \text{ e } T_c$$

3.3.1. Recristalização

É sabido da tecnologia de congelação que o efeito da congelação na textura do alimento é tanto maior quanto maior a dimensão média dos cristais de gelo formados, pelo que uma congelação lenta afecta muito a textura enquanto que uma congelação muito rápida permitiria obter um produto de boa qualidade. Este facto deve-se em geral ao maior volume específico dos cristais de gelo em relação à água líquida, que provoca uma ruptura das paredes celulares, com consequente perda de rigidez do tecido vegetal. Este mesmo efeito é essencial na consideração da protecção da viabilidade celular na preparação de culturas microbianas.

A utilização de sistemas criogénicos (congelação por imersão em nitrogénio ou dióxido de carbono líquido) permite obter produtos de óptima qualidade, devido à rapidíssima taxa de congelação conseguida. Uma tecnologia particularmente interessante actualmente em desenvolvimento com um impacto ainda maior na qualidade é a congelação em alta pressão. Esta maior qualidade depende contudo da manutenção da estrutura formada aquando da congelação. No entanto, se a temperatura de armazenamento for superior a T_g' , é inevitável a recristalização dos cristais de gelo. Em gelados, produtos que são consumidos congelados, o tamanho

dos cristais de gelo é muito importante na textura. De acordo com Blanshard and Franks (1987), a dimensão máxima de cristais de gelo em gelados deve ser $40\ \mu\text{m}$, dado que acima desta dimensão os consumidores detectam uma textura granulosa.

Dois mecanismos de recristalização são particularmente destrutivos para a estrutura: migração e agregação, dado que deles resulta um aumento do tamanho dos cristais (com consequente diminuição do seu número). A estrutura protegida graças a uma tecnologia avançada de congelação perde-se durante o armazenamento, correndo-se o risco de o produto ao chegar ao consumidor ter perdido em grande extensão a sua melhor qualidade. É consequentemente fundamental descrever a velocidade de recristalização e os factores que a influenciam para controlar esta perda de qualidade. Podem ser utilizados aditivos que inibem a recristalização (açúcares, polissacáridos, agentes crioprotectores - Roos, 1995). O modo como funcionam diferentes tipos de compostos na inibição da recristalização não é inteiramente compreendido, nem é explicado só pelo efeito em T_g (é evidente que um aditivo que aumente T_g diminui a velocidade de recristalização porque diminui a mobilidade da matriz), contrariamente às afirmações de Levine e Slade (1989). A interacção físico-química entre os aditivos e os cristais de gelo é igualmente importante, conduzindo frequentemente a um efeito protector mais marcado que o resultante do incremento de T_g (Goff *et al.*, 1993). Outro efeito possível resulta de um aumento da viscosidade da solução crio-concentrada (existente acima de T_g'), que diminui a velocidade de recristalização.

Outro aspecto importante em relação a fenómenos de cristalização é a formação de cristais de açúcares. Em produtos consumidos congelados (o caso dos gelados) a formação de grandes cristais de lactose é um dos principais factores do aparecimento

de textura areada ("sandiness"). Em relação a este fenómeno, é importante recordar alguns aspectos sobre cristalização. O crescimento de cristais envolve várias etapas, destacando-se a nucleação (1ª etapa) e a propagação (2ª etapa). A velocidade de cristalização é tanto maior quanto maior a nucleação ou maior a propagação. A temperaturas próximas de T_m' (superiores), a velocidade de nucleação é máxima, mas a velocidade de propagação é muito baixa, dado que a estrutura está próxima da transição de estado vítreo. A temperaturas próximas da temperatura de congelação (inferiores), a velocidade de propagação é máxima, dado que a estrutura tem o seu máximo de mobilidade, mas a velocidade de nucleação é baixa. Consequentemente, a velocidade de cristalização máxima ocorre algures no estado flexível. Daqui se conclui que um produto congelado pode estar a ser armazenado a uma temperatura tal que a velocidade de cristalização é elevada.

Da discussão anterior importa reter a importância da descrição da velocidade de cristalização/recristalização e do modo como a temperatura e o teor de água a afectam. Embora a aplicação do conceito de transição de estado vítreo seja importante, existem vários casos em que as interações moleculares entre aditivos (particularmente agentes crioprotectores) e os cristais (de gelo ou de açúcares) assume idêntica importância.

3.3.2. Oxidação, coalescência e crescimento microbiano

Em diversos produtos congelados, são também relevantes outros fenómenos que decorrem a uma determinada velocidade acima de T_g' , nomeadamente a oxidação de açúcares ou de lípidos, sobretudo por via não-enzimática; a coalescência da fase orgânica em emulsões e o crescimento de micro-organismos. Em geral, a velocidade de

crescimento microbiano é demasiado lenta comparativamente aos outros factores degradativos, em produtos congelados.

Em qualquer caso, existe um aspecto em comum em relação a estes fenómenos: dependem fortemente da mobilidade molecular no sistema, não só da mobilidade de moléculas de água, mas também de outras. As velocidades destas reacções/metabolismos correlacionam-se normalmente bastante bem com a difusão e consequentemente com a teoria cinética aplicada no contexto da teoria de transição de estado vítreo, descrita seguidamente, pelo que o conhecimento do diagrama de fases (T_g e T_g') e dos factores que o afectam é o aspecto mais essencial a considerar.

3.3.3. Modelagem da mobilidade na matriz

A cinética de reacções de oxidação, de taxa de coalescência de uma fase dispersa, do crescimento de micro-organismos e da velocidade de cristalização e recristalização correlaciona-se normalmente bem com a mobilidade molecular na solução crio-concentrada. Por sua vez, esta correlaciona-se obviamente com o tempo médio de relaxação molecular do arranjo conformacional à temperatura em causa.

Williams, Landel e Ferry (1955) deduziram uma equação para relacionar o tempo médio de vibração molecular acima de T_g com a temperatura, conhecida por equação WLF:

$$\log \frac{\tau}{\tau_g} = \frac{-C_1(T - T_g)}{C_2 + (T - T_g)} \quad (1)$$

em que τ é o tempo médio de relaxação molecular à temperatura T e τ_g o respectivo valor na transição de estado vítreo, T_g . C_1 e C_2 são constantes do sistema, que têm o valor universal de 17.44 e 51.6 (°C), respectivamente. Esta equação reduz-se efectivamente à equação proposta

por Doolittle (1951) com base na teoria do volume livre. A viscosidade mostra uma relação do mesmo tipo e, compreensivelmente, a velocidade de qualquer fenómeno controlado por difusão também, dada a sua evidente relação com a viscosidade.

Esta equação não é no entanto aplicada normalmente na forma referida. Variados autores mostraram que a utilização das constantes universais não oferece a melhor correlação com dados experimentais, sendo preferível obter C_1 e C_2 por ajuste da equação aos valores experimentais. Para além disso, a maioria das propriedades de interesse teria valores extremamente elevados (ou baixos, no caso de velocidades de reacção ou de metabolismos celulares) a T_g , o que tornaria a sua determinação experimental quase impossível e a regressão problemática. No seu trabalho original, Williams, Landel e Ferry (1955) sugeriram substituir T_g por uma temperatura de referência, determinada pela regressão dos dados experimentais, tendo verificado para vários compostos inorgânicos, orgânicos e polímeros sintéticos que esta temperatura se situava cerca de 50 °C acima de T_g . Trabalhos posteriores de Ferry (1980) e de Peleg (1992) sugeriram ainda uma outra forma possível, resultante de uma troca das temperaturas de referência:

$$\log \frac{a}{a_r} = \frac{-C_1'(T - T_r)}{(T - T_\infty)} \quad (2)$$

em que a representa a propriedade em questão (viscosidade, velocidade de reacção, etc.), T_r é a temperatura de referência, T_∞ outra temperatura de referência situada abaixo de T_g e $C_1' = C_1.C_2 / (C_2 - T_g + T_r)$. Neste caso, pode ser fixado o valor de T_r em qualquer temperatura para a qual existam valores de a (a_r), devendo o valor de T_∞ ser preferencialmente obtido pela regressão (Roos, 1995). Ferry (1980) considerou que T_∞ seria da ordem de $T_g - 50$ °C.

A equação de WLF tem sido aplicada em diferentes contextos,

sendo provavelmente a maior área de aplicação a determinação de velocidades de oxidação não-enzimática, por ser um dos principais mecanismos de perda de qualidade em ambientes com teores de água em solução baixos (produtos congelados ou secos). O sucesso tem sido variável. Os autores gostariam de referir que a capacidade de ajustar dados experimentais à equação 1 ou 2 se tem mostrado muito sensível à regressão e em particular à temperatura de referência, tendo obtido melhores resultados efectuando uma análise preliminar do nível de significância dos parâmetros da regressão e das regiões de confiança, determinando com essa base estatística a melhor temperatura de referência para o ajuste. Com esta abordagem conseguimos em particular ajustar os dados publicados por Nelson (e Labuza), 1993, sobre degradação de ácido ascórbico em maltodextrina 25, que os investigadores reportaram não se adaptar bem ao modelo WLF. Para além disso, obtivemos valores de C_1 e C_2 estatisticamente semelhantes aos obtidos nos nossos trabalhos de

degradação de ácido ascórbico em maltodextrina 12, conforme indicado na tabela 1, apesar da diferença na maltodextrina e nas temperaturas de operação. Os modelos correlacionam em ambos os casos cerca de 150 a 200 pontos experimentais.

A importância da temperatura de referência tem ainda implicações na colinearidade entre os valores de C_1 e C_2 , que verificamos ser mínima no ponto de maior significância dos parâmetros e menor região de confiança (ponto escolhido para T_r). Encontramos também este tipo de efeitos em ajustes de cinéticas diversas com o modelo de Arrhenius (e.g. Saraiva *et al*, 1996).

A mobilidade numa matriz parcialmente congelada (isto é, a temperaturas entre T_g' e a temperatura de congelação do produto inicial) requer não só o conhecimento de T_g' , mas do diagrama de fases. Acima de T_g' , a solução crio-concentrada está no estado flexível, contendo tanto mais água quanto maior a temperatura, isto é, para cada temperatura existe uma concentração da solução crio-

concentrada correspondente e portanto um T_g . A uma determinada temperatura de armazenamento superior a T_g' existe pois um valor de T_g que quantifica simultaneamente a mobilidade da matriz e o efeito da crio-concentração/diluição resultante da variação da quantidade de água efectivamente congelada (cristais de gelo).

4. Conclusões e perspectivas futuras

A qualidade de produtos congelados requer uma política integrada. Investimentos dispendiosos em tecnologias de congelação capazes de produzir produtos de maior qualidade à porta da fábrica podem verificar-se pouco úteis se essa qualidade se for deteriorando significativamente durante a cadeia de distribuição, até ao consumidor. Infelizmente, armazenar a temperaturas abaixo de T_g' é inviável para a maioria dos produtos. Por outro lado, é inevitável que os produtos sejam sujeitos a flutuações de temperatura (com

Tabela 1. Parâmetros do modelo de WLF para os resultados experimentais de Nelson (1993) e dos autores, para degradação de ácido ascórbico em maltodextrina

Matriz	Nelson (1993)		Autores	
	MD 25		MD12	
Gama de T	4 - 68 °C		80 - 140 °C	
	valor	intervalo 95%	valor	intervalo 95%
D_r (min)	1.13×10^6	$1.73 \times 10^5 - 2.09 \times 10^6$	728	479.6 - 975.6
T_r^* (°C)	20	12.8-17.8	150	139.8-160.7
C_1	3.23	2.0-4.5	6.36	3.4-9.3
C_0	99	64.0-134.0	380	111.7-649.2

* determinada como o valor que minimiza o erro da regressão e a colinearidade dos parâmetros C_1 e C_2 .

D é o tempo decimal de redução, ou factor D.

entradas e saídas de armazéns, camiões, expositores, etc.). Quanto maior a qualidade do produto logo após a congelação, tanto maior será o interesse em garantir a melhor capacidade possível de resistir à degradação de qualidade, isto é, de minimizar as velocidades dos fenómenos mais cruciais para o produto em causa.

É importante buscar uma compreensão adequada da transição de estado vítreo e de fenómenos de cristalização/recristalização na matriz. Idealmente, pretendê-se-ia aumentar T_g , inibir e controlar a nucleação de cristais e controlar o crescimento de cristais de gelo e a recristalização. A formulação do produto pode ser alterada de modo a atingir estes objectivos, alterando alguns ingredientes ou adicionando alguns aditivos adequados. Neste âmbito, assume especial interesse a utilização de pré-tratamentos osmóticos, utilizando compostos crio-protectores (ou outros) na solução osmótica. Devem ser explorados possíveis efeitos sinérgicos, pelo que os resultados tendem a ser específicos do sistema em análise.

A crescente compreensão da importância da micro-estrutura e da conformação molecular no controlo da qualidade dos alimentos tem trazido grandes avanços na obtenção de produtos de maior valor acrescentado. A aplicação de elementos da teoria de transição de estado vítreo tem melhorado a nossa capacidade de compreender e descrever as realidades dos sistemas com que procuramos lidar. A combinação desse conhecimento com tecnologias recentes capazes de criar novas conformações, como a alta pressão, pode permitir obter num futuro próximo produtos com características muito interessantes para a exploração de nichos de mercado nos segmentos altos.

Embora esta comunicação se tenha cingido ao caso dos alimentos, é evidente do texto a aplicação em outras áreas de biotecnologia, como a

produção de preparações enzimáticas e culturas celulares, onde se pretende preservar a actividade ou viabilidade celular. Cita-se como exemplo o trabalho de Franks e Hatley (1992), que utilizaram estes conceitos inovadores na formulação de preparações de enzimas com tempo de vida mais alargado.

Referências

Allen, G. (1993). A history of the glassy state. In "The Glassy State in Foods", Blanshard, J. e Lillford, P. (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 1-12

Blanshard, J. e Franks, F. (1987). Ice crystallization and its control in frozen food systems. In "Food Structure and Behaviour", Blanshard, J. and Lillford, P. (Eds.), Academic press, Orlando, USA, pp 51-65

Blanshard, J. e Lillford, P. (Eds.) (1993). *The Glassy State in Foods*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 103-122

Doolittle, A. (1951). Studies in Newtonian flow. II - The dependence of the viscosity of liquids on free space. *Journal of Applied Physics*, 22, pp 1471-1475

Ehrenfest, P. (1933). *Proceedings of the Academy of Sciences of Amsterdam*, 36: 153. citado por Wundelich, B. (1981). The basis of thermal analysis. In "Thermal Characterization of Polymeric Materials", Turi, E. (Ed.), Academic press, New York, USA, pp. 91-234

Ferry, J. (1980). *Viscoelastic Properties of Polymers*. John Wiley & Sons., New York, USA

Franks, F. e Hatley, R. (1992). Stable enzymes by water removal. In "Stability and Stabilisation of Enzymes", van den Tweel, W., Harder, A. e Buitelaar, R. (Eds.) Elsevier Applied Science Pub., Chichester, UK, pp 459-466

Gibbs, J. e DiMarzio, E. (1958). Nature of the glass transition and the glassy state. *Journal of Chemical Physics*, 28, pp 373-383

Goff, H., Caldwell, K., Stanley, D. e Maurice, T. (1993). The influence of polysaccharides on the glass transition in frozen sucrose solutions and ice cream. *Journal of Dairy Science*, 76, pp 1268-1277

Karel, M. (1975). Water activity and food preservation. In "Principles of Food Science - Part II", Fennema, O. (Ed.), Marcel Dekker, New York, USA, pp 237-263

Kokini, J., Cocero, A., Madeka, H., e de Graaf, E. (1994). The development of state diagrams for cereal proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 5, pp 281-288.

Levine, H. e Slade, L. (1989). A food polymer science approach to the practice of cryostabilization technology. *Comments on Agricultural and Food Chemistry*, 1, pp 316-396

Luyben, W. (1990). Process Modelling, Simulation and Control for Chemical Engineers. McGraw-Hill, New York, USA, pp 415-420

MacInnes, W. (1993). Dynamic mechanical thermal analysis of sucrose solutions. In "The Glassy State in Foods", Blanshard, J. e Lillford, P. (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 223-248

Mansfield, M. (1993). An overview of theories of the glass transition. In "The Glassy State in Foods", Blanshard, J. e Lillford, P. (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 103-122

Nelson, K. (1993). Reaction kinetics in food stability: comparison of glass transition and classical models for temperature and moisture dependence. PhD thesis, U. Minnesota, USA.

Peleg, M. (1992). On the use of the WLF model in polymers and foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, pp 59-66

Roos, Y. (1995). *Phase Transitions in Foods*. Academic Press, London, UK

Roos, Y. e Karel, M. (1991). Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 26, pp 553-566

Saraiva, J., Oliveira, J., Hendrickx, M., Oliveira, F. e Tobback, P. (1996). Analysis of the inactivation kinetics of freeze-dried α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* at different moisture contents. *LWT - Food Science and Technology*, 29, pp 260-266

Slade, L. e Levine, H. (1986). A polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products. *Carbohydrate Polymers*, 6, pp 213-244

Slade, L. e Levine, H. (1991). Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 30, pp 115-360

Slade, L., Levine, H. e Finley, J. (1988). Protein-water interactions: water as a plasticizer of gluten and other protein polymers". In "Protein Quality and the Effects of Processing", Phillips, D. e Finley, J. (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp 9-124

Williams, M., Landel, R. and Ferry, J. (1955). The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and othe glass-forming liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 77, pp 3701-3707

trabalho. Agradecimentos são ainda devidos a Ted Labuza e Kathryn Nelson (U. Minnesota) pela gentil cedência de resultados experimentais para o nosso trabalho.

(continua nação da página 3)

18th ISSY

"Yeast Nutrition and Natural Habitats"

24 - 29 Agosto, 1997, Bled, Eslovénia

Informações:

Organising Committee of 18th Issy

Prof. Dr. P. Raspor

Biotechnical Faculty
Jmnikarjeva 101, 1000 Ljubljana
Slovenia
Tel. +386-61-1231161
Fax: +386-61-274092
E-mail: issy97@bf.uni.lj.si

V Jornadas de Biologia de Leveduras

"Professor Nicolau van Uden"
4 - 5 Julho, 1997, Viseu

Inscrições:

Prof. Virgilio Loureiro
Instituto Superior de Agronomia
1399 LISBOA CODEX
Data limite: 4 Junho 1997

Agradecimentos

Os autores gostariam de exprimir o seu agradecimento a W. Mike MacInnes (Nestlé, Suíça) pela sua inestimável colaboração no nosso



B|BRAUN

B. Braun Medical Lda. Divisão de Biotecnologia

Queluz Park
Estrada Consiglieri Pedroso, 80
Queluz de Baixo
2745 BARCARENA

Tel. (01) 4368266 / 4368200
Fax (01) 4368289 / 4368280
Tel. Assistência Técnica (01) 4368246

B. Braun Biotech International

Aagitadores - Banhos Maria - Banhos refrigerados - Centrifugas (refrigeradas) - Microcentrifugas
Centrifugas para banco de sangue - Fermentadores - Fermentadores de cultura celular
Homogenizadores - Liofilizadores

Sanyo

Arcas congeladoras a -40°C, -85°C e -152°C - Armários refrigerados
Armários refrigerados para banco de sangue - Autoclaves - Estufas de incubação
Estufas refrigeradas - Frigoríficos combinados - Incubadoras de CO2 - Máquinas de gelo
Termocicladores (Amplificadores de DNA)

Sanyo Gallenkamp / MSE / Fistream / Filotron

Aparelhos de determinação do ponto de fusão - Câmaras climáticas
Câmaras para crescimento de plantas - Câmaras de estabilidade farmacêutica
Centrifugas (refrigeradas) - Microcentrifugas - Centrifugas para banco de sangue
Desionizadores - Destiladores e bi-destiladores - Estufas de esterilização - Estufas de incubação