

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NA
GEMA DE OVO DURANTE O CONGELAMENTO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
Título de Doutor em Engenharia de Alimentos

VÂNIA REGINA NICOLETTI TELIS
Engenheira Química
Mestre em Engenharia de Alimentos

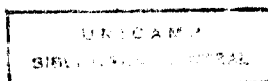
PROF. DR. THEO GUENTER KIECKBUSCH
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defen-
dida por VÂNIA REGINA NICO-
LETTI TELIS e aprovada pela
Comissão Julgadora em 30 de
abril de 1996.

Campinas - SP
Março de 1996

Campinas, 30 de abril de 1996
Seu
PROF. DR. THEO G. KIECKBUSCH
Presidente da Banca



EMPRESA	BC
CHAMADA	T/UNICAMP
	T/237e
V.	F.
	27691
	667/96
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	21/05/96
N° CPD	C/M.00088485-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

T237e

Telis, Vânia Regina Nicoletti

Estudo das alterações estruturais na gema de ovo durante o congelamento / Vânia Regina Nicoletti Telis. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Theo Guenter Kieckbusch

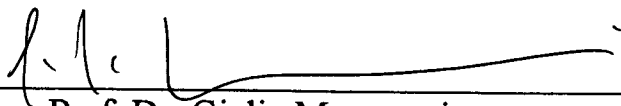
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Gema de ovo. 2. *Congelamento. 3.* Gelificação.
4. Reologia. I. Kieckbusch, Theo Guenter. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

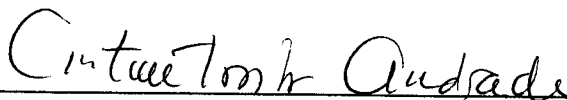
BANCA EXAMINADORA



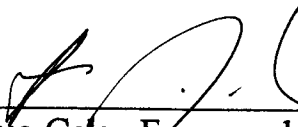
Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
(Orientador)



Prof. Dr. Giulio Massarani
(Membro)



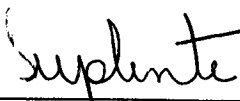
Profa. Dra. Cristina Tristão Andrade
(Membro)



Prof. Dr. Antonio Celso Fonseca de Arruda
(Membro)



Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral
(Membro)



Prof. Dr. Watson Loh
(Membro)



Prof. Dr. Alfredo de Almeida Vitali
(Membro)

Campinas, 30 de abril de 1996.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch, pela dedicação e pelo apoio durante a orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral, pelas valiosas sugestões no decorrer da pesquisa.

À FEA/UNICAMP, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento do trabalho.

Ao DETA/IBILCE/UNESP, pela concessão de afastamento parcial das atividades docentes para o desenvolvimento experimental do trabalho.

Ao Laboratório de Engenharia de Petróleo da FEM/UNICAMP, pela utilização do reômetro Vilastic.

Ao Laboratório de Análise Térmica do IQ/UNICAMP, pela realização das análises de calorimetria diferencial de varredura.

À FAPESP, ao FAEP/UNICAMP, à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À ITO AVICULTURA IND. COM., pela doação da matéria-prima.

Ao Márcio, Alessandra, Isaías, Pompeo e Rosângela, pela agradável companhia durante as horas de trabalho.

*Aos meus pais.
Ao Javier.*

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
NOMENCLATURA	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Composição Química da Gema de Ovo	4
2.1.1. Microestrutura da Gema de Ovo	5
2.1.2. Lipoproteína de Baixa Densidade (LBD)	6
2.2. Gelificação da Gema de Ovo Durante o Congelamento	8
2.2.1. Efeito de Aditivos na Gelificação da Gema	12
2.3. Teoria da Crioestabilização	14
2.4. Emprego de Medidas Reológicas Dinâmicas	18
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Matéria-prima	24
3.3.1. Determinação do Teor de Sólidos Totais	24
3.2. Preparação das Amostras	24
3.2.1. Adição de Crio-protetores	25
3.3. Congelamento	25
3.4. Reologia	26
3.5. Microscopia Óptica	30
3.6. Calorimetria Diferencial de Varredura	30
3.7. Temperatura de Início de Congelamento	31
3.8. Determinação da Entalpia e Fração de Água Congelada	32
4. Resultados e Discussão	36
4.1. Estudo da Gelificação Empregando Medidas Reológicas	36
4.1.1. Estrutura dos Géis Formados Durante o Congelamento	36
4.1.2. Efeitos da Velocidade de Congelamento e Temperatura de Estocagem	65
4.1.3. Efeito de Aditivos	81
4.2. Temperatura de Transição Vítreas	98
4.3. Temperatura de Início de Congelamento	107
4.4. Fração de Água Congelada	108
4.5. Microscopia Óptica	113
5. Conclusões	121
Apêndice A Cálculo dos Tempos de Congelamento	125
Apêndice B Termogramas	128
Anexo A Dados de Entalpia e Calor Específico de Riedel (1957)	141
Referências Bibliográficas	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Composição média da gema de ovo.	5
Figura 2.2	Composição dos sólidos totais da gema.	6
Figura 2.3	Composição da lipoproteína de baixa densidade (LBD) da gema de ovo.	7
Figura 2.4	Diagrama de fases de um sistema binário.	17
Figura 3.1	Evolução da temperatura no centro térmico da amostra em função do tempo de imersão no meio refrigerante.	27
Figura 3.2	Tensão de cisalhamento versus deformação para gema em estado nativo.	29
Figura 3.3	Tensão de cisalhamento versus deformação para gema congelada/descongelada a -20 °C por 24 horas.	30
Figura 3.4	Curvas de temperatura em função do tempo para gema com 2% de NaCl.	32
Figura 4.1	Evolução do módulo de relaxação em um sistema polimérico (GRAESSLEY, 1984).	38
Figura 4.2	Evolução dos módulos de armazenamento e dissipação em função da frequência para sistemas poliméricos (GRAESSLEY, 1984).	38
Figura 4.3	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema pura congelada a -8 °C por 22 horas.	40
Figura 4.4	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema pura congelada a -24 °C por 17 horas.	41
Figura 4.5	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema pura congelada a -24 °C por 22 horas.	42
Figura 4.6	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da deformação da gema pura congelada a -24 °C por 23 horas.	44
Figura 4.7	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de NaCl sem congelar.	46
Figura 4.8	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de NaCl congelada a -24 °C por 36 horas.	46
Figura 4.9	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de NaCl sem congelar.	47
Figura 4.10	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de NaCl congelada a -24 °C por 22 horas.	47
Figura 4.11	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de sacarose sem congelar.	50
Figura 4.12	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de sacarose congelada a -24 °C por 36 horas.	50
Figura 4.13	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de sacarose sem congelar.	51

Figura 4.14	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de sacarose congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.	51
Figura 4.15	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de glicerol sem congelar.	52
Figura 4.16	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de glicerol congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.	53
Figura 4.17	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de glicerol sem congelar.	53
Figura 4.18	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de glicerol congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.	54
Figura 4.19	Representação esquemática do mecanismo de ação de crioprotetores por exclusão ou ligação preferencial à superfície das proteínas (CROWE et alii, 1990).	55
Figura 4.20	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de KCl sem congelar.	56
Figura 4.21	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de KCl congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.	56
Figura 4.22	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de KCl sem congelar.	57
Figura 4.23	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de MgCl_2 sem congelar.	59
Figura 4.24	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de MgCl_2 congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.	59
Figura 4.25	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de MgCl_2 sem congelar.	60
Figura 4.26	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de MgCl_2 congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.	60
Figura 4.27	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de CaCl_2 sem congelar.	62
Figura 4.28	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de CaCl_2 congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.	62
Figura 4.29	Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de CaCl_2 sem congelar.	63
Figura 4.30	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da temperatura de estocagem da gema pura após 23 horas, com tempos de congelamento dados pela Tabela 4.2.	66
Figura 4.31	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') da gema pura, submetida à crio-estruturação a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, em função da temperatura de estocagem após 23 horas.	66

Figura 4.32	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura em função do tempo de estocagem a $-14,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. As linhas tracejadas correspondem a amostras submetidas à crio-estruturação antes da estocagem.	68
Figura 4.33	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura em função do tempo de estocagem a $-20,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. As linhas tracejadas correspondem a amostras submetidas à crio-estruturação antes da estocagem.	68
Figura 4.34	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura em função do tempo de estocagem a $-24,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. As linhas tracejadas correspondem a amostras submetidas à crio-estruturação antes da estocagem.	69
Figura 4.35	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura submetida à crio-estruturação, em função do tempo de estocagem a $-28,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.	69
Figura 4.36	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura submetida à crio-estruturação, em função do tempo de estocagem a $-37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.	70
Figura 4.37	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura submetida à crio-estruturação, em função do tempo de estocagem a $-78,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.	70
Figura 4.38	Variação da velocidade de gelificação determinada experimentalmente e da viscosidade da solução congelada dada pela equação WLF em função do afastamento da temperatura em relação a T_g' .	75
Figura 4.39	Gráfico para determinação das constantes da equação do tipo Arrhenius.	76
Figura 4.40	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura super-resfriada em função do tempo de estocagem a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.	78
Figura 4.41	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura super-resfriada em função do tempo de estocagem a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$.	79
Figura 4.42	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura congelada em função do tempo de estocagem a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.	79
Figura 4.43	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura congelada em função do tempo de estocagem a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$.	80
Figura 4.44	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de NaCl em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	81
Figura 4.45	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 10% (em peso) de NaCl em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	82
Figura 4.46	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de NaCl.	83
Figura 4.47	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema após 26 horas de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função da concentração (% em peso) de NaCl.	83
Figura 4.48	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de sacarose em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	85

Figura 4.49	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 10% (em peso) de sacarose em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	85
Figura 4.50	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de sacarose.	86
Figura 4.51	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema após 26 horas de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função da concentração (% em peso) de sacarose.	86
Figura 4.52	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de glicerol em função	88
Figura 4.53	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 10% (em peso) de glicerol em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	89
Figura 4.54	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de glicerol. do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	89
Figura 4.55	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema após 26 horas de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função da concentração (% em peso) de glicerol.	90
Figura 4.56	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de MgCl_2 em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	91
Figura 4.57	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 10% (em peso) de MgCl_2 em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	92
Figura 4.58	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de MgCl_2 .	92
Figura 4.59	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema após 26 horas de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função da concentração (% em peso) de MgCl_2 .	93
Figura 4.60	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de KCl em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	94
Figura 4.61	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de KCl .	95
Figura 4.62	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de CaCl_2 em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.	96
Figura 4.63	Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de CaCl_2 .	97
Figura 4.64	Termograma para gema pura congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e descongelada a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos.	99
Figura 4.65	Ampliação do termograma apresentado na Figura 4.64.	100
Figura 4.66	Derivada do fluxo de calor (q) em função da temperatura, correspondente ao termograma da Figura 4.64.	100
Figura 4.67	Termograma (ampliado) correspondente à gema pura em estado nativo.	101
Figura 4.68	Derivada do fluxo de calor (q) em função da temperatura, correspondente ao termograma da Figura 4.67.	101

Figura 4.69	Termograma (ampliado) correspondente à gema pura em estado nativo (primeira repetição).	103
Figura 4.70	Termograma (ampliado) correspondente à gema pura em estado nativo (segunda repetição).	103
Figura 4.71	Termograma para gema com 10% (em peso) de sacarose.	104
Figura 4.72	Termograma para gema com 10% (em peso) de NaCl.	104
Figura 4.73	Termograma para gema com 10% (em peso) de KCl.	105
Figura 4.74	Termograma para gema com 10% (em peso) de $MgCl_2$.	105
Figura 4.75	Termograma para gema com 10% (em peso) de $CaCl_2$.	106
Figura 4.76	Valores de entalpia para a gema pura experimentais e estimados pela equação proposta por SCHWARTZBERG (1981).	109
Figura 4.77	Micrografia da gema pura sem congelar.	115
Figura 4.78	Micrografia da gema pura congelada/descongelada.	115
Figura 4.79	Micrografia da gema com 2% de NaCl sem congelar.	115
Figura 4.80	Micrografia da gema com 2% de NaCl congelada/descongelada.	115
Figura 4.81	Micrografia da gema com 10% de NaCl sem congelar.	116
Figura 4.82	Micrografia da gema com 10% de NaCl congelada/descongelada.	116
Figura 4.83	Micrografia da gema com 2% de sacarose sem congelar.	116
Figura 4.84	Micrografia da gema com 2% de sacarose congelada/descongelada.	116
Figura 4.85	Micrografia da gema com 10% de sacarose sem congelar.	117
Figura 4.86	Micrografia da gema com 10% de sacarose congelada/descongelada.	117
Figura 4.87	Micrografia da gema com 2% de $MgCl_2$ sem congelar.	117
Figura 4.88	Micrografia da gema Termograma de gema com 10% em peso de NaCl.com 2% de $MgCl_2$ congelada/descongelada.	117
Figura 4.89	Micrografia da gema com 10% de $MgCl_2$ sem congelar.	118
Figura 4.90	Micrografia da gema com 10% de $MgCl_2$ congelada/descongelada.	118
Figura B.1	Termograma de gema pura em estado nativo.	129
Figura B.2	Termograma de gema pura em estado nativo (repetição).	130
Figura B.3	Termograma de gema pura em estado nativo (repetição).	131
Figura B.4	Termograma de gema pura em estado nativo (repetição).	132
Figura B.5	Termograma de gema pura congelada a -20 °C por 24 horas e descongelada a 20 °C por 20 minutos.	133
Figura B.6	Termograma de gema pura congelada a -20 °C por 24 horas e descongelada a 20 °C por 20 minutos (repetição).	134
Figura B.7	Termograma de gema pura congelada a -20 °C por 24 horas e descongelada a 20 °C por 20 minutos (repetição).	135
Figura B.8	Termograma de gema com 10% em peso de NaCl	136

Figura B.9	Termograma de gema com 10% em peso de KCl.	137
Figura B.10	Termograma de gema com 10% em peso de $MgCl_2$.	138
Figura B.11	Termograma de gema com 10% em peso de $CaCl_2$.	139
Figura B.12	Termograma de gema com 10% em peso de Sacarose.	140
Figura AA.1	Calor específico em função da temperatura da gema de ovo com vários teores de umidade (RIEDEL, 1957).	141
Figura AA.2	Entalpia e fração de água congelada da gema de ovo em função da temperatura e do teor de umidade (RIEDEL, 1957).	142

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1	Frequências correspondentes ao cruzamento das curvas de G' e G'' para gema tratada com diferentes aditivos antes e depois do congelamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.	48
Tabela 4.2	Tempos de congelamento em função da temperatura do meio de refrigeração.	67
Tabela 4.3	Valores de $\alpha = dG'/dt$ em função da temperatura de estocagem (T) de amostras submetidas à crio-estruturação. A relação $\log (\eta/\eta_R)$ é calculada pela Equação 4.2, com $C_1 = 12,3$ e $C_2 = 23,3$.	74
Tabela 4.4	Efeitos dos aditivos sobre as propriedades viscoelásticas da gema antes e após o congelamento.	97
Tabela 4.5	T_g' para gema com aditivos ao nível de 10% em peso.	106
Tabela 4.6	Temperaturas de início de congelamento (T_{ic}) da gema de ovo.	107
Tabela 4.7	Valores de entalpia para a gema pura: experimentais e estimados pela equação proposta por SCHWARTZBERG (1981).	110
Tabela 4.8	Valores de entalpia e fração de água congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ para gema com aditivos.	112
Tabela A.1	Temperatura do centro térmico da amostra em função do tempo, para temperatura do meio igual -12 e $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.	127

NOMENCLATURA

b	Fração de água ligada, <i>adimensional</i>
C_p	Calor específico, <i>kcal/kg °C</i>
E_a	Energia de ativação, <i>kcal/mol K</i>
f	Frequência, <i>Hz</i>
G'	Módulo de armazenamento, <i>Pa</i>
G''	Módulo de dissipação, <i>Pa</i>
G^*	Módulo complexo, <i>Pa</i>
$G(t)$	Módulo de relaxação, <i>Pa</i>
H	Entalpia, <i>kcal/kg</i>
$J(t)$	Função “creep-compliance”, <i>Pa⁻¹</i>
m	Massa, <i>kg</i>
n_p	Fração de água congelada, <i>adimensional</i>
n_w	Umidade do produto, <i>adimensional</i>
q_c	Capacidade térmica do calorímetro, <i>kcal</i>
R	Constante universal dos gases ideais, <i>kcal/mol K</i>
t	Tempo, <i>s</i>
T	Temperatura, <i>°C</i>
T_g	Temperatura de transição vítrea, <i>°C</i>
T_g'	Temperatura de transição vítrea da matriz maximamente concentrada, <i>°C</i>
T_{ic}	Temperatura de início de congelamento, <i>°C</i>

Letras Gregas

α	Variação de G' em função do tempo de estocagem (dG'/dt), <i>Pa/s</i>
γ	Deformação no cisalhamento, <i>adimensional</i>
$\dot{\gamma}$	Taxa de deformação no cisalhamento, <i>s⁻¹</i>
η'	Viscosidade, <i>Pa.s</i>

η''	Elasticidade, <i>Pa.s</i>
η^*	Viscosidade complexa, <i>Pa.s</i>
ρ	Massa específica, <i>kg/m³</i>
σ	Tensão de cisalhamento, <i>Pa</i>
ω	Frequência, <i>rad</i>
δ	Ângulo de fase, <i>rad</i>

Índices

c	Congelado
e	Embalagem
f	Final
m	Fusão
p	Produto (gema)
g	Referente à temperatura de transição vítrea
w	Água
0	Inicial

RESUMO

Neste trabalho foram estudados os efeitos do tempo e temperatura de estocagem e da velocidade de congelamento sobre a gelificação da gema de ovo durante o congelamento, através da determinação da viscoelasticidade do material por meio de ensaios reológicos dinâmicos e do emprego de calorimetria diferencial de varredura. Também foram examinados os efeitos da adição de sacarose, glicerol e dos sais NaCl, KCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$.

Os resultados indicam que o gel formado durante o congelamento é baseado na agregação das macromoléculas, causada por interações físicas, e não pela ocorrência de ligações químicas. Além disso, verificou-se que os géis não possuem estrutura homogênea.

A adição de sacarose, glicerol ou cloreto de magnésio é capaz de impedir a gelificação. Entretanto, o NaCl, embora impeça o aumento da elasticidade do material, aumenta sua viscosidade, mesmo antes do congelamento. O cloreto de cálcio, por sua vez, tem efeito oposto, atuando como agente de coagulação de proteínas e aumentando a viscoelasticidade.

A influência da temperatura e do tempo de estocagem do material congelado sobre suas propriedades viscoelásticas foi abordada considerando a transição vítrea da matriz maximamente concentrada, que circunda os cristais de gelo no sistema congelado. Observou-se que a influência da temperatura de estocagem não é tão acentuada quanto seria esperado de acordo com a cinética WLF. Na faixa de temperaturas entre $-37,5$ e -14 °C a cinética de gelificação em função da temperatura de estocagem obedece a uma equação do tipo Arrhenius.

ABSTRACT

The effects of freezing and frozen storage time and temperature, as well as addition of salts, sucrose and glycerol in freeze-thaw gelation of hen's egg yolk was studied using dynamic rheological methods and by differential scanning calorimetry. The results indicate that the gel formed during freezing is based on physical aggregation rather than chemical binding, having a non-homogeneous structure. Addition of sucrose, glycerol and magnesium chloride prevents gelation, while sodium chloride increases the viscosity of yolk before freezing. The calcium chloride showed an opposite effect, acting as a coagulation agent and increasing the viscoelasticity. The dependence of yolk viscoelasticity on freezing and storage time and temperature is discussed considering the glass transition of the maximally freeze-concentrated amorphous matrix surrounding the ice crystals (T_g') in the frozen system. The influence of frozen storage temperature was found to be less important than expected from WLF kinetics. An Arrhenius behaviour was followed in the temperature range between -37,5 and -14 °C.

1. INTRODUÇÃO

A gema de ovo é um ingrediente de grande importância na indústria de alimentos, sendo fundamental na fabricação de produtos de panificação, sorvetes, doces, massas e maionese. Sua principal função é atuar como um emulsificante, estabilizando gotículas dispersas graças à sua capacidade de reduzir a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleica.

É prática comum na indústria de alimentos utilizar a gema já submetida a diversos tratamentos, como pasteurização, congelamento ou desidratação, que objetivam aumentar sua vida-de-prateleira e garantir um produto homogêneo e de utilização segura sob o ponto de vista microbiológico, bem como otimizar a utilização da gema e do albume, nem sempre necessários na proporção em que se encontram naturalmente.

O Brasil apresenta um grande potencial para a industrialização e exportação de produtos derivados de ovos (gema, albume e ovo integral). Em 1994, a produção nacional de ovos foi estimada em cerca de 13,5 bilhões de unidades e apenas 4% desse total (30.000 toneladas) sofreu algum tipo de processamento antes do consumo. Para a exportação foram destinadas aproximadamente 6.000 toneladas de gema, ovo integral e albume, sempre na forma congelada (Relatório da APA, 1995).

Embora os produtos derivados de ovos ofereçam grandes vantagens sobre o produto in natura, deve-se considerar alguns pontos negativos. A gema é muito sensível a qualquer tipo de processamento. O congelamento, em particular, causa uma alteração irreversível em suas propriedades reológicas, levando-a a apresentar uma consistência característica de gel.

A gelificação é um fenômeno indesejável, pois compromete o emprego do produto na formulação de alimentos pela dificuldade de misturá-lo aos outros ingredientes e pela perda parcial de suas propriedades funcionais.

O interesse pela gelificação da gema de ovo durante o congelamento/descongelamento teve seu auge nos anos sessenta. Todos os estudos efetuados a nível macroscópico durante essa época e mesmo posteriormente, abordaram o problema com a ajuda da reologia clássica, empregando ensaios de cisalhamento constante. Observava-se o aumento da viscosidade aparente do sistema e interpretava-se, quantitativamente, o fenômeno da gelificação. Esses ensaios porém, implicam na destruição, pelo menos temporária, da estrutura espacial do gel, não permitindo a obtenção de informações relativas à conformação molecular do material.

Neste trabalho, optou-se por empregar testes reológicos dinâmicos, isto é, de cisalhamento oscilatório, que não implicam na destruição da estrutura espacial do gel (desde que se trabalhe no domínio da viscoelasticidade linear), além de efetivamente permitir uma avaliação do caráter elástico e viscoso do material. Não foi encontrado, na bibliografia, nenhum outro trabalho que utilize essa técnica no estudo da gelificação da gema de ovo durante o congelamento/descongelamento.

Buscando analisar o problema da gelificação da gema de acordo com as tendências atuais da ciência de alimentos, na discussão e interpretação dos resultados foram empregados conceitos relativos à ciência dos polímeros, principalmente no que diz respeito à influência da temperatura de congelamento e estocagem no grau de gelificação. Essa abordagem segue uma corrente que vem ganhando força entre os pesquisadores da área, principalmente a partir da década de noventa.

O próximo Capítulo do trabalho apresenta uma revisão sobre a composição química e a microestrutura da gema de ovo, sendo apontadas as publicações mais relevantes que abordam o fenômeno da gelificação da gema e que serviram de base para o presente trabalho. Também discute-se brevemente a importância da temperatura de transição vítrea no processamento e estocagem de produtos alimentícios e, em seguida, o emprego de medidas reológicas dinâmicas no estudo da gelificação.

Após a descrição dos materiais e métodos utilizados, o que é feito no Capítulo 3, são apresentados os resultados de ensaios reológicos dinâmicos, onde procura-se explicitar o efeito do congelamento e da presença de aditivos na estrutura

do gel formado, através de curvas dos módulos de armazenamento e dissipação em função da frequência.

Ensaio reológico dinâmico também foram empregados no estudo da cinética de gelificação em função da velocidade de congelamento, tempo e temperatura de estocagem e presença de aditivos, cujos resultados encontram-se nos itens 4.1.2 e 4.1.3.

Essa discussão é seguida dos resultados obtidos através de calorimetria diferencial de varredura, os quais foram usados na determinação da temperatura de transição vítrea da gema, permitindo explicar alguns pontos importantes a respeito da cinética de gelificação.

O Capítulo 4 é encerrado com algumas observações sobre o efeito de aditivos na estrutura da gema, feitas através de microscopia óptica.

Finalmente, no Capítulo 5, estão apresentadas as principais conclusões do trabalho, bem como algumas sugestões para trabalhos futuros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Composição Química da Gema de Ovo

Antes de iniciar a apresentação de dados de composição e estrutura, é importante esclarecer que este trabalho refere-se, exclusivamente, à gema de ovos de galinha e, portanto, em toda a discussão que segue, fica implícito que se trata de ovos desse tipo de ave.

A gema de ovo é um sistema complexo que apresenta em torno de 50% de água, sendo a matéria sólida constituída, principalmente, de lipídios e proteínas, numa proporção de 2:1.

De acordo com MARION et alii (1964), o teor de sólidos totais da gema apresenta uma média em torno de 52,3%, enquanto KLINE et alii (1965) encontraram uma média de 52,7% de sólidos. Decorrido algum tempo após a postura, o teor de sólidos diminui devido à migração de umidade da clara para a gema (STADELMAN & COTTERILL, 1986).

O conteúdo de lipídios da gema depende da linhagem das poedeiras, mas situa-se entre 32 e 36% (MARION et alii, 1965). Segundo PRIVETT et alii (1962), estes distribuem-se em triglicerídios (65,5%), fosfolipídios (28,3%) e colesterol (5,2%). RHODES & LEA (1957) verificaram que, entre os fosfolipídios, as maiores frações são 73% de fosfatidilcolina (lecitina) e 15% de fosfatidiletanolamina (cefalina).

As proteínas constituem 15,7% dos sólidos da gema segundo LE CLERK & BAILEY (1940) e 16,6% segundo ROMANOFF & ROMANOFF (1949).

Além de lipídios e proteínas, a gema pode conter até 1% de carboidratos. Destes, aproximadamente 30% encontram-se ligados a proteínas (glicoproteínas). Entre os carboidratos livres, o principal é a glicose, na proporção de 20% (STADELMAN & COTTERILL, 1986).

O conteúdo de elementos inorgânicos é de cerca de 1% (na forma de cinzas). Entre estes, os principais são o fósforo, o cálcio e o potássio (STADELMAN & COTTERILL, 1986).

A Figura 2.1 mostra os principais constituintes da gema de ovo e suas respectivas frações médias.

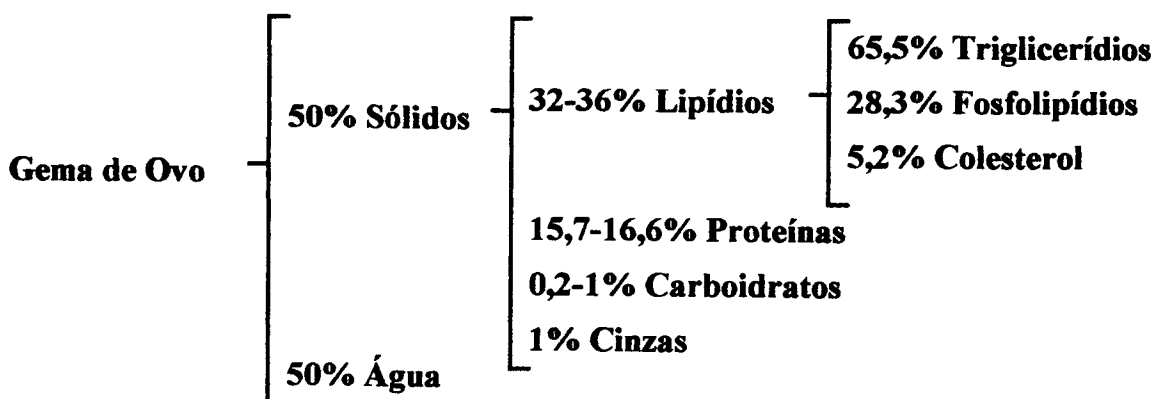


Figura 2.1 - Composição média da gema de ovo.

2.1.1. Microestrutura da Gema de Ovo

Por centrifugação a alta velocidade (20.000g por 12 horas), a gema pode ser separada em duas frações: uma formada por grânulos sedimentados e outra solúvel, denominada plasma (SCHMIDT et alii, 1956).

De acordo com SAARI et alii (1964a), os grânulos (lavados com água) contêm, em base seca, cerca de 34% de lipídios, 60% de proteínas e 6% de cinzas, incluindo 0,5% de cátions divalentes como o cálcio. Os fosfolipídios compõem 37% dos lipídios totais e consistem essencialmente de fosfatidilcolina (82%) e fosfatidiletanolamina (15%). Segundo BURLEY & COOK (1961), os grânulos representam de 11 a 13% do volume total da gema e, em base seca, constituem cerca de 23% dos sólidos totais. Seu conteúdo de água (grânulos não lavados) é de 44%.

A fração proteica dos grânulos é formada por 70% de lipovitelinas (α e β), 16% de fosvitina e 12% de lipoproteína de baixa densidade. A fosvitina (ou fosfoviteína) é uma proteína livre de lipídios, ao passo que a lipovitelina e a lipoproteína de baixa densidade são proteínas conjugadas, que encontram-se combinadas com moléculas de lipídios.

O plasma, por sua vez, é composto de livetinas (α , β e γ), que são proteínas globulares livres de lipídios, e de lipoproteína de baixa densidade. As livetinas e a lipoproteína de baixa densidade representam, respectivamente, 10 e 66% dos sólidos totais da gema (McCULLY et alii, 1962; STADELMAN & COTTERILL, 1986).

A composição dos sólidos totais da gema encontra-se esquematizada na Figura 2.2. Verifica-se que a lipoproteína de baixa densidade é a substância presente em maior quantidade, constituindo aproximadamente dois terços dos sólidos totais.

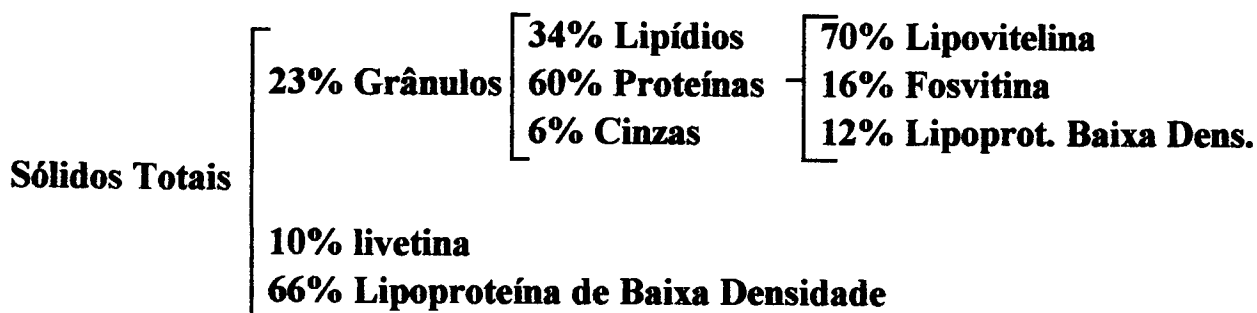


Figura 2.2 - Composição dos sólidos totais da gema.

2.1.2. Lipoproteína de Baixa Densidade (LBD)

As lipoproteínas são complexos formados por lipídios neutros, fosfolipídios e proteínas, com propriedades que diferem daquelas de seus componentes mas não são estabilizadas por ligações covalentes. A composição da LBD da gema de ovo é apresentada na Figura 2.3 (BURLEY, 1975).

GARLAND & POWRIE (1978) compararam a composição da LBD proveniente dos grânulos com a fração da LBD obtida do plasma por SAARI et alii (1964a). Os resultados mostram que ambas são bastante semelhantes quanto ao conteúdo de lipídios. KOCAL et alii (1980) determinaram a composição da fração proteica da LBD (apoproteína) dos grânulos e concluíram que a mesma é semelhante à apoproteína da LBD do plasma.

Existem evidências (COOK & MARTIN, 1962) de que a LBD tem a estrutura de uma micela, formada por um núcleo de lipídios neutros e uma superfície hidrofílica composta por proteínas e fosfolipídios. Segundo MARTIN et alii (1964), este tipo de LBD provavelmente não contém água interna, mas sim uma superfície hidratada devido aos grupos hidrofílicos. A hipótese de que as proteínas distribuem-se sobre a superfície da micela de LBD foi reforçada por SAARI et alii (1964a), que demonstraram que a papaína pode hidrolizar suas frações proteicas.

Devido à sua alta concentração, atribui-se à LBD o poder de determinar a maioria das propriedades físicas e químicas importantes da gema. Isso foi confirmado por KAMAT et alii (1973), que estudaram a preparação de massas nas quais a gema integral foi substituída pelas suas várias frações. Os autores observaram que LBD é essencial para a produção de massas de qualidade satisfatória.

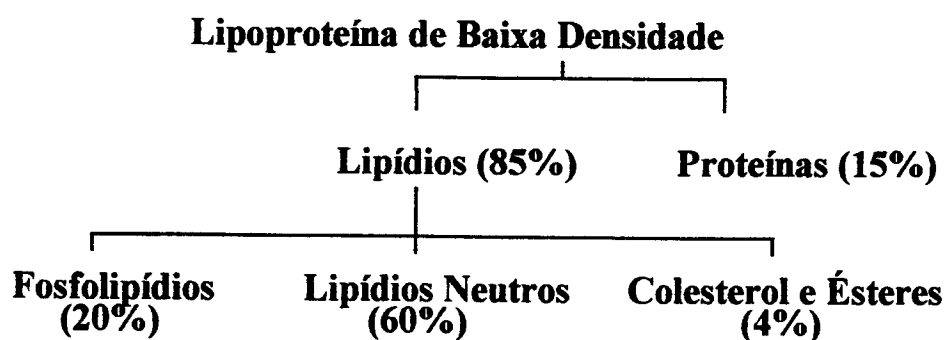


Figura 2.3 - Composição da lipoproteína de baixa densidade (LBD) da gema de ovo.

2.2. Gelificação da Gema de Ovo Durante o Congelamento

Quando a gema de ovo é submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento, verifica-se que as suas propriedades reológicas sofrem alterações irreversíveis. A gema adquire uma consistência pastosa, semelhante a um gel, num processo comumente designado gelificação. O grau de gelificação depende das condições de congelamento e descongelamento.

Com base no trabalho de MORAN (1925), POWRIE (1973) afirma que a gelificação só ocorre quando a temperatura da gema atinge níveis inferiores a -6°C . Caso a temperatura seja mantida no intervalo de $-0,65^{\circ}\text{C}$ (temperatura de início de congelamento da gema) a -6°C , não se verifica nenhuma alteração em suas propriedades reológicas. Essa afirmação foi comprovada por POWRIE et alii (1963), que verificaram que, quando congelada a -7°C , a gema sofre apenas um ligeiro acréscimo em sua viscosidade aparente. Esse efeito torna-se muito mais intenso quando a temperatura de trabalho chega a -10°C e a -14°C . No mesmo trabalho, demonstra-se que a elevação da viscosidade é fortemente dependente do tempo de estocagem a baixas temperaturas. Quando a gema é mantida a -10°C , sua viscosidade passa de 20 a 600 Poise em aproximadamente 500 min de estocagem. Por outro lado, na armazenagem a -14°C , a viscosidade atinge 900 Poise em apenas 350 min.

A mesma tendência foi observada por CHANG et alii (1977), embora a ordem de grandeza dos resultados seja bastante diferente. A -10°C a viscosidade da gema levou mais de 72 h para atingir aproximadamente 550 Poise, enquanto que, quando a temperatura de armazenagem chegou a -14°C , em apenas 6 h a viscosidade atingiu o mesmo valor.

A taxa de congelamento também aparece como um fator preponderante para o grau de gelificação. CHANG et alii (1977) verificaram que amostras de gema congeladas rapidamente em nitrogênio líquido (-196°C), armazenadas por três

semanas a -80 °C e depois submetidas a descongelamento rápido a 25 °C, não apresentaram alterações em sua fluidez.

Sendo a gema de ovo um sistema complexo, composto de partículas e micelas em suspensão e que, por sua vez, combinam lipídios e proteínas, existem diversos autores que procuram identificar quais são os componentes responsáveis pela gelificação a baixas temperaturas. Para isso, a metodologia utilizada consiste no fracionamento da gema por centrifugação a alta velocidade, o que resulta em grânulos sedimentados e plasma (CHANG et alii, 1977; HASIAK et alii, 1972; MAHADEVAN et alii, 1969). Através de métodos que combinam etapas de ultracentrifugação, diluição em solução de eletrólitos e diálise, é possível conseguir frações adicionais da gema (SAARI et alii, 1964a; KURISAKI et alii, 1980; WAKAMATU et alii, 1982). A fração de menor densidade, denominada lipoproteína de baixa densidade (LBD) é a que tem sido alvo de maior atenção por parte dos pesquisadores e é frequentemente apontada como sendo a maior responsável pela gelificação.

No trabalho de CHANG et alii (1977) foi comparado o aumento de viscosidade de amostras congeladas/descongeladas (em condições idênticas) de gema integral e de plasma, tendo sido observado que o aumento de viscosidade da gema integral é mais intenso em relação ao plasma, o que indica que os grânulos (presentes na gema integral e não no plasma) aumentam o grau de gelificação. Experimentos adicionais, usando eletroforese e microscopia eletrônica, levaram à conclusão de que durante o armazenamento da gema em temperaturas inferiores a -6 °C, os grânulos se rompem (presumivelmente pelo aumento da concentração de íons causado pela formação de gelo) e liberam micelas de LBD. As micelas de LBD (aquelas presentes originalmente no plasma e aquelas liberadas pelos grânulos) formariam agregados com excelente capacidade de ligação com a água, provocando a gelificação.

Através da utilização de diversas técnicas experimentais (medidas de viscosidade, filtração por gel de agarose, microscopia eletrônica e calorimetria diferencial de varredura), KAMAT et alii (1976) concluíram que a agregação da LBD

ocorre devido à concentração das partículas causada pela transformação da água (solvente) em gelo.

A capacidade de gelificação dos grânulos é questionada por MAHADEVAN et alii (1969) devido ao fato de que o plasma congelado e armazenado a -8 °C formou um gel após o descongelamento, ao mesmo tempo em que os grânulos dispersos em água (pesos iguais de água e grânulos) e mantidos a -20 °C por 24 h não sofreram gelificação.

É importante observar que, enquanto CHANG et alii (1977) trabalharam com grânulos dispersos no próprio plasma, MAHADEVAN et alii (1969) substituíram o plasma por água, o que poderia ser um indicativo de que na realidade o plasma é o principal elemento da formação do gel.

Utilizando micrografia eletrônica de varredura, HASIAK et alii (1972) observaram que o congelamento/descongelamento da gema integral tem um grande efeito na sua microestrutura, dando-lhe um aspecto de malha grosseira, com grandes espaços vazios, ao contrário da gema em estado nativo, cuja micrografia revela inúmeros e pequenos espaços vazios. Comparando os efeitos do congelamento/descongelamento na microestrutura das frações de alta e baixa densidade da gema, os autores verificaram que ambas sofrem alterações em grau semelhante.

Na maioria dos trabalhos que buscam um fracionamento maior da gema, indo além das duas frações (grânulos e plasma) obtidas por centrifugação, é possível encontrar evidências experimentais de que o componente de maior envolvimento na gelificação é a LBD, que representa cerca de 66% dos sólidos totais da gema (STADELMAN & COTTERILL, 1986) e é encontrada em maior quantidade no plasma.

Verificou-se (POWRIE et alii, 1963) que as propriedades eletroforéticas de uma fração de LBD obtida do plasma são alteradas durante o ciclo de

congelamento/descongelamento. Houve uma grande perda de mobilidade, o que foi justificado pela formação de agregados sem poder migratório.

A hipótese de agregação de LBD também é defendida por SAARI et alii (1964b). Nesse estudo, o plasma foi congelado/descongelado e submetido a um fracionamento posterior, com o objetivo de observar possíveis alterações nas propriedades da LBD. Verificou-se que as frações obtidas apresentavam maior turbidez que as frações nativas (não congeladas) e não tinham nenhuma mobilidade durante a eletroforese em papel.

KURISAKI et alii (1980) procuraram identificar quais eram os componentes liberados após a destruição da micela de LBD durante o congelamento. Seus resultados levaram à conclusão de que no congelamento as micelas de LBD perdem os componentes situados em sua superfície, os quais são responsáveis pela estabilização de sua natureza particulada. Essa desestabilização seria uma etapa inicial da gelificação, induzindo o rearranjo estrutural e a agregação da LBD.

Um estudo com objetivos semelhantes foi realizado por WAKAMATU & SATO (1980), porém, com conclusão contrária à citada anteriormente. Esses autores sustentam que a gelificação não é causada pela liberação ou remoção dos componentes superficiais da micela de LBD, mas sim induzida pela diminuição da água de hidratação.

Em um trabalho posterior, WAKAMATU et alii (1982) isolaram os agregados resultantes da gelificação da gema através da filtração por gel e identificaram seus componentes através de análise química e eletroforética. A composição dos agregados não diferiu significativamente daquela da LBD. Isso os levou a concluir que outros componentes da gema (livetina, lipovitelina e fosvitina) não participam diretamente da formação de agregados. Além disso, consideraram que a conclusão anterior, de que não há liberação de componentes da LBD durante a gelificação, é reforçada por esse resultado.

Como se vê, existe uma concordância dos pesquisadores envolvidos quanto à participação da LBD no processo de gelificação da gema durante o congelamento.

Entretanto, quando se trata de estabelecer o mecanismo dessa participação aparecem contradições.

2.2.1. Efeito de Aditivos na Gelificação da Gema

A gelificação da gema também é influenciada pela presença de crioprotetores. Sal (NaCl) e açúcar (sacarose) são os aditivos comumente empregados industrialmente. De acordo com a utilização final da gema, um dos dois é selecionando. Entretanto, além de comprometer o emprego do produto, o real poder destes solutos de impedir a gelificação ainda não foi totalmente esclarecido.

De acordo com POWRIE et alii (1963), a alteração da viscosidade da gema devido ao congelamento/descongelamento é reduzida pela adição de sacarose. Uma concentração de 0,014 moles de sacarose/100 g de gema faz com que a viscosidade aparente passe de 14 para 22 Poise após o congelamento a -14 °C por 120 min e descongelamento, enquanto que a gema sem nenhum aditivo tem sua viscosidade aumentada de 20 para 275 Poise quando submetida às mesmas condições. Por outro lado, o NaCl causa o aumento da viscosidade da gema nativa. A adição de 0,14 moles de NaCl/100 g de gema é responsável por uma grande elevação de sua viscosidade aparente antes mesmo do congelamento: de 24 para 410 Poise. Entretanto, após o congelamento esse valor mantém-se praticamente inalterado. Isso mostra que o efeito inibidor de gelificação do NaCl é duvidoso, porque também provoca a perda parcial da fluidez da gema. POWRIE (1973) atribui esse efeito à ruptura dos grânulos pela alta concentração de sal e à dispersão de material contido em seu interior.

A gema com 15% de clara (proporção geralmente encontrada na indústria devido à separação mecânica da gema e da clara) foi utilizada por PALMER et alii (1969) em seus experimentos. Além disso, esses autores empregaram condições mais severas de congelamento e estocagem. Após o congelamento a -29 °C por 5 dias e estocagem a -18 °C por um mês, a gema sem adição de açúcar teve sua viscosidade

aumentada de 3 para 6000 Poise. Com adição de 10% de açúcar, a gema submetida ao mesmo tratamento apresentou viscosidade de 960 Poise.

O efeito da presença de NaCl, sacarose, glicerol e dimetilsulfóxido sobre a agregação da LBD durante o congelamento foi estudado por SOLIMAN & VAN DEN BERG (1971). Neste trabalho as soluções de LBD foram preparadas em tampão de fosfato de sódio. A essa solução foram adicionadas diferentes quantidades das substâncias citadas acima, em substituição a uma quantidade equivalente de fosfato de sódio. Em todos os casos, a redução de concentração de fosfato de sódio diminuiu a agregação da LBD quantificada através de medidas da turbidez das soluções. Verificou-se que a substituição pelo NaCl foi a mais eficiente no sentido de inibir a agregação, sendo o glicerol a substância menos eficaz. A partir dos resultados, os autores afirmam que a principal função do NaCl e da sacarose é impedir que a concentração do fosfato na fase não congelada atinja níveis muito altos, já que o fosfato inorgânico é o íon presente em maior quantidade na gema de ovo.

HASIAK et alii (1972) verificaram, através de micrografia de transmissão eletrônica, que o tratamento da gema com 10% de NaCl provoca a ruptura das partículas presentes na gema, consideradas como sendo formadas por LBD, tanto nas amostras congeladas quanto nas não congeladas. A aparência de ambas é semelhante à observada em amostras não congeladas de plasma da gema.

Segundo SATO & AOKI (1975), WAKAMATU et alii (1983) e WAKAMATU (1994), o impedimento ou não da gelificação pela adição de sais como o NaCl ou o KCl estaria ligado à temperatura de formação de uma mistura eutética entre o sal e a água. Essa teoria é baseada em resultados experimentais que mostram que a presença de NaCl em concentrações de até 2% em soluções de LBD impede a alteração de sua viscosidade e turbidez após o congelamento/descongelamento. Para concentrações maiores, no entanto, o resultado é oposto. Além disso, o aumento da viscosidade e da turbidez é tanto maior quanto mais baixa for a temperatura de congelamento. A justificativa desse comportamento seria a de que existe a formação de um complexo entre a LBD, a água e o sal e, a baixas concentrações este último estaria

completamente envolvido neste complexo. Em concentrações maiores, uma parte do sal estaria presente na solução na forma de íons livres. À medida que a temperatura da solução é reduzida ocorre a formação de gelo, aumentando a concentração do sal na fase líquida até ocorrer a formação de uma mistura eutética. Nesse momento, a água envolvida no complexo é deslocada para participar da mistura eutética, o que desestabiliza a LBD e favorece a gelificação.

2.3. Teoria da Crioestabilização

O efeito de aditivos na gelificação da gema de ovo pode ser considerado sob um outro ponto de vista, baseado na teoria da crioestabilização.

A teoria da crioestabilização é uma abordagem apresentada por LEVINE & SLADE (1988) que se sustenta na consideração de que existem diversos pontos em comum entre os polímeros sintéticos e as moléculas componentes da maioria dos produtos alimentícios, como por exemplo os carboidratos e as proteínas. Os elementos-chave dessa teoria (LEVINE & SLADE, 1989) incluem o reconhecimento de que:

- 1) os produtos alimentícios comportam-se como materiais poliméricos clássicos e este comportamento é governado mais pelos aspectos dinâmicos do que pelos aspectos energéticos;
- 2) a temperatura de transição vítrea (T_g), na qual ocorre a transição do estado vítreo para o estado borrachoso (“rubbery”), é um parâmetro físico-químico que pode ser determinante durante o processamento e na manutenção da qualidade e estabilidade dos produtos alimentícios;
- 3) a água desempenha papel fundamental como agente plastificante de alimentos naturais ou processados no estado amorfo, afetando sua T_g ;
- 4) os estados vítreo e borrachoso, caracterizados por serem estados de não-equilíbrio (em oposição às fases termodinâmicas, de equilíbrio), têm grande significância nos produtos alimentícios, uma vez que afetam as propriedades mecânicas e estruturais

dependentes do tempo e relacionadas à qualidade e estabilidade durante o armazenamento.

Segundo esses autores, tais conceitos podem ser empregados na proteção dos produtos alimentícios, armazenados por longos períodos em temperaturas de congelamento típicas ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$), contra alterações indesejáveis na textura, estrutura e composição química. A chave para essa proteção, e consequente melhora da qualidade e estabilidade do produto durante o armazenamento, reside na manipulação de suas propriedades físico-químicas e termomecânicas através do controle do estado estrutural da matriz amorfa, concentrada, que circunda os cristais de gelo em um sistema congelado.

A temperatura de transição vítrea (T_g) é o parâmetro mais importante dessa abordagem, uma vez que as alterações estruturais indesejáveis (colapso) dos materiais amorfos são explicadas através de um mecanismo físico-químico generalizado, baseado nessa temperatura, específica de cada material e correspondente à ocorrência de uma transição de ordem estrutural. Esse mecanismo pode ser descrito da seguinte maneira (SLADE & LEVINE, 1991): quando a temperatura do meio (durante o processo ou armazenamento) torna-se maior que T_g , o volume livre do sistema aumenta, levando ao aumento da mobilidade cooperativa de seguimentos das cadeias poliméricas ou de pequenas moléculas nas regiões amorfas. Consequentemente, a viscosidade local torna-se inferior à viscosidade típica de cerca de 10^{12} Pa.s observável em T_g , permitindo o escoamento a nível microscópico. Nesse estado borrachoso, a difusão translacional pode ocorrer em uma escala temporal de ordem prática e a relaxação da estrutura passa a obedecer a cinética de Williams, Landel e Ferry (WLF), que prediz o crescimento logarítmico da taxa de relaxação mecânica em função de $\Delta T = (T - T_g)$. Por outro lado, quando a temperatura é mantida abaixo de T_g , no estado de sólido amorfo (vítreo), a mobilidade molecular é muito pequena, fazendo com que a taxa de relaxação obedece a uma cinética do tipo Arrhenius, isto é, o aumento da taxa é linear, em base logarítmica, em função de ΔT .

Para a transição do estado vítreo em um sistema amorfo, existem dois caminhos possíveis: o aquecimento, elevando a temperatura do meio para um valor superior a T_g ou o aumento do conteúdo de umidade, que causa a redução da T_g , para um nível inferior ao da temperatura do sistema.

Em sistemas mantidos em temperaturas negativas, aparece um outra temperatura característica, identificada como T_g' , que corresponde à temperatura de transição vítrea da matriz maximamente concentrada que circunda os cristais de gelo em uma solução congelada (LEVINE & SLADE, 1988).

A Figura 2.4 ilustra a dependência da temperatura de transição vítrea (T_g) em função da concentração de soluto em uma solução binária. Em altas concentrações de solutos, T_g ocorre a temperaturas superiores ao ponto de congelamento (T_{ic}). Dessa forma, o resfriamento da solução conduz ao estado vítreo, de baixa mobilidade molecular, onde as transformações físico-químicas são muito lentas em relação à escala de tempo usual na manipulação e armazenagem dos alimentos. Por outro lado, quando a concentração do soluto é inferior à correspondente ao ponto T_g' , o resfriamento da solução conduz a um estado intermediário entre o líquido e o vítreo, onde o material existe como uma solução supersaturada, de comportamento viscoelástico. Nessas condições, as moléculas têm mobilidade suficiente para que ocorram alterações estruturais no produto em um tempo relativamente curto, reduzindo sua estabilidade química e física.

Na prática, o colapso estrutural, em suas diferentes manifestações, poderia ser evitado, mantendo a qualidade e estabilidade dos alimentos, através de uma das seguintes medidas: armazenamento em temperaturas inferiores a T_g (ou T_g' em alimentos congelados); formulação adequada do produto, de forma a manter sua T_g acima da temperatura de processamento ou estocagem, aumentando o peso molecular médio de seus componentes solúveis, o que se consegue com a adição de estabilizantes poliméricos; ou, quando possível diminuição do conteúdo de umidade, através da desidratação e uso de embalagem apropriada.

A temperatura de transição vítrea (T_g) pode ser determinada, experimentalmente, através de ensaios de calorimetria diferencial de varredura (DSC - differential scanning calorimetry). Essa técnica fornece a diferença entre as quantidades de energia absorvidas ou liberadas pelo material que está sendo analisado e por um material de referência, enquanto ambos são submetidos a um programa de temperatura controlada. Qualquer alteração termicamente induzida é registrada como um pico (transição de 1ª ordem) ou como uma inflexão (transição de 2ª ordem) no termograma, sendo possível identificar a temperatura em que se dá a transição e a quantidade de energia envolvida (entalpia de transição).

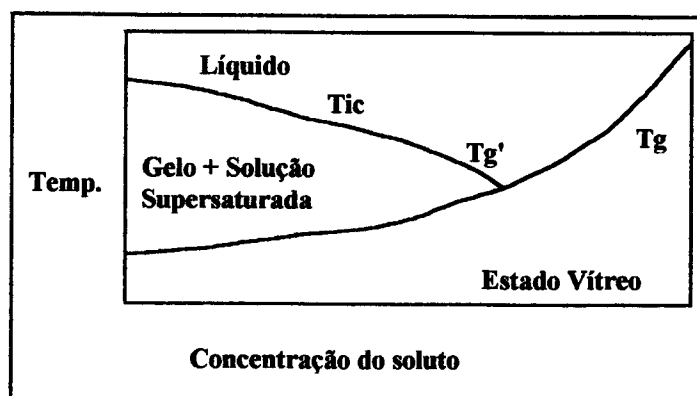


Figura 2.4 - Diagrama de fases de um sistema binário.

Em um termograma, a transição vítrea aparece como uma transição de segunda ordem, indicada pela mudança da capacidade calorífica do material, em que a quantidade de energia envolvida é muito menor que a correspondente à fusão do gelo. Isso faz com que T_g nem sempre seja facilmente detectável. LEVINE & SLADE (1988, 1989) apresentam termogramas típicos de soluções de glicose e maltodextrina onde T_g e T_g' podem ser identificadas. Entretanto, SIMATOS et alii (1989) alertam para o fato de que em materiais alimentícios, a determinação experimental de T_g nem sempre é possível.

2.4. Emprego de Medidas Reológicas Dinâmicas

Como citado anteriormente, diversos pesquisadores (POWRIE et alii, 1963; CHANG et alii, 1977) já empregaram medidas reológicas no acompanhamento da cinética de gelificação da gema. Entretanto, o parâmetro utilizado foi a viscosidade aparente, determinada em testes reológicos não-oscilatórios. O aumento da viscosidade aparente, por si só não caracteriza a formação de um gel. A definição de gel segundo PAPKOV (citada por BEZRUKOV, 1979) é a seguinte: sistemas multicomponentes caracterizados pela baixa fluidez e pela alta reversibilidade das deformações sofridas. FLORY (1974) afirma que um sistema pode ser considerado como gelatinoso se for caracterizado pelas seguintes propriedades: é um sistema coloidal formado por, no mínimo, dois componentes; manifesta certas propriedades mecânicas de um sólido; tanto os componentes dispersos quanto o meio de dispersão estão continuamente distribuídos no volume do sistema. Ambas as definições concordam que um gel tem propriedades intermediárias entre um sólido (elástico) e um líquido (viscoso) e, portanto, apresenta comportamento viscoelástico (BARNES et alii, 1989; ALFREY & GUERNEE, 1956).

Em um líquido perfeitamente viscoso, a tensão depende apenas da taxa de deformação. Um líquido viscoso não tem "memória"; o trabalho mecânico necessário para produzir qualquer deformação é dissipado instantaneamente. Por outro lado, em um sólido perfeitamente elástico, a tensão depende somente da magnitude da deformação sofrida. O trabalho mecânico empregado na deformação é armazenado na forma de energia elástica. Uma substância viscoelástica apresenta um comportamento híbrido: ao mesmo tempo em que uma parte da energia recebida durante a sua deformação é armazenada, a outra é dissipada. A tensão depende da história da deformação; algum tempo se passa antes que o material "esqueça" sua forma anterior (GRAESSLEY, 1984).

A análise de um material com tais características é bastante facilitada quando o mesmo apresenta um comportamento viscoelástico linear. Nessas condições, a razão entre a tensão e a deformação em qualquer instante ou frequência é

independente da magnitude da tensão ou deformação aplicada (MITCHELL, 1980). Na maioria dos materiais viscoelásticos, a linearidade é observada quando se trabalha com deformações muito pequenas. Pode-se dizer, nesse caso, que os efeitos elásticos seguem a lei de Hooke e os efeitos viscosos obedecem a lei de Newton (ALFREY & GUERNEE, 1956).

Existem vários tipos de experimentos que podem ser utilizados para estudar os materiais viscoelásticos e determinar as relações entre tensão, deformação e tempo. Os mais importantes são os de "creep recovery", os de "stress relaxation" e os testes dinâmicos.

Nos ensaios de "creep recovery", a aplicação da tensão de cisalhamento é feita segundo uma função degrau, isto é, é aplicada instantaneamente e mantida constante ao longo do tempo. Enquanto isso, monitora-se a deformação sofrida pelo corpo. Os resultados são expressos em termos da função $J(t)$, denominada "creep compliance" e dada pela razão entre a deformação e a tensão de cisalhamento em qualquer tempo t , enquanto a tensão for mantida constante.

Em um experimento de "stress relaxation", o material é submetido repentinamente a uma dada deformação, ao mesmo tempo em que determina-se a tensão necessária para mantê-la constante ao longo do tempo. Como resultado obtém-se a função $G(t)$, denominada módulo de relaxação e calculada como sendo a razão entre a tensão de cisalhamento e deformação em qualquer instante t , enquanto a deformação permanece constante. Nesse tipo de teste, pode-se também obter o tempo de relaxação, um parâmetro viscoelástico bastante importante, definido como o tempo necessário para que a tensão seja reduzida para $1/e$ do valor inicial, onde e é a base dos logaritmos neperianos. O tempo de relaxação é uma medida da taxa de dissipação de tensão pelo material.

Na análise e interpretação dos resultados desses experimentos aplicam-se modelos mecânicos, constituídos de molas e amortecedores viscosos arranjados em série ou em paralelo, de forma que o sistema comporte-se analogamente a um material viscoelástico real. Se esses elementos forem arranjados em série, tem-se o modelo de

Maxwell, onde a deformação total (γ) será a soma das deformações da mola e do amortecedor. Se as peças forem dispostas em paralelo, obtém-se o modelo de Kelvin (ou Voigt), em que a tensão total (σ) será a soma da tensão de cada elemento, enquanto as deformações da mola e do amortecedor serão iguais. Esses modelos são usados apenas como representação do comportamento macroscópico do material, não contribuindo com nenhuma indicação das bases moleculares do fenômeno da viscoelasticidade.

Apesar da simplicidade dos dois tipos de experimentos descritos acima, eles apresentam duas desvantagens. A primeira é o fato de que, para obter informações completas sobre o comportamento viscoelástico de um material, é necessário efetuar medidas ao longo de várias décadas da escala de tempo. Isso, além de prolongar indesejavelmente o ensaio, pode causar, particularmente em produtos biológicos, alterações físicas e químicas na amostra testada. O segundo ponto negativo é a impossibilidade de se conseguir que a aplicação da tensão ou deformação no início do experimento seja verdadeiramente instantânea. Essas desvantagens podem ser eliminadas com o emprego de testes reológicos dinâmicos, nos quais o material é deformado periodicamente, por uma tensão que varia senoidalmente com o tempo. Um ensaio periódico, a uma frequência de oscilação ω , equivale quantitativamente a um teste não-estacionário no tempo $1/\omega$, permitindo que se obtenha uma quantidade considerável de informações correspondentes a tempos muito curtos. Os testes dinâmicos permitem calcular o módulo elástico (G') e o módulo de dissipação mecânica (G'') sobre uma grande faixa de frequências. A dissipação mecânica está associada com a perda de energia e o aquecimento devido ao atrito entre as moléculas. Os testes dinâmicos também têm-se mostrado úteis no estudo da estrutura molecular de materiais viscoelásticos (MOHSENIN, 1986).

O modelo geral da teoria da viscoelasticidade linear, baseado no princípio de que os efeitos de alterações sequenciais na deformação são aditivos, é escrito como (FERRY, 1980):

$$\alpha(t) = -\int_{-\infty}^t G(t-t') \dot{\gamma}(t') dt' \quad (2.1)$$

onde $\dot{\gamma} = \partial\gamma/\partial t$ é a taxa de deformação, $G(t)$ é o módulo de relaxação e a integração é feita sobre todo o tempo passado (t') até o tempo atual (t).

Quando se trata de testes reológicos dinâmicos, o material viscoelástico (linear) é sujeito a uma tensão oscilatória senoidal, de frequência ω (rad/s), e verifica-se que a deformação também sofre alterações senoidais, mas está defasada da tensão. Seja $\gamma = \gamma^0 \sin \omega t$, onde γ^0 é a amplitude máxima da deformação, então $\dot{\gamma} = \omega \gamma^0 \cos \omega t$. Por substituição na equação (2.1) obtém-se:

$$\alpha(t) = -\int_0^\infty G(s) \omega \gamma^0 \cos[\omega(t-s)] ds \quad (2.2)$$

onde $s = t-t'$.

Resolvendo-se a função trigonométrica (cosseno de uma diferença), a equação (2.2) pode ser reescrita como uma soma de integrais funções de $G(s)$:

$$\alpha(t) = \gamma^0 \left[\omega \int_0^\infty G(s) \sin \omega s ds \right] \sin \omega t + \gamma^0 \left[\omega \int_0^\infty G(s) \cos \omega s ds \right] \cos \omega t \quad (2.3)$$

O termo em $\sin \omega t$ está em fase com γ e o termo em $\cos \omega t$ está defasado em 90° . A equação (2.3) pode ser escrita de forma mais conveniente como:

$$\alpha(t) = \gamma^0 (G' \sin \omega t + G'' \cos \omega t) \quad (2.4)$$

Dessa forma são definidas duas funções dependentes da frequência:

$G'(\omega)$ = módulo de armazenamento

$G''(\omega)$ = módulo de dissipação

A partir de relações trigonométricas, pode-se escrever a tensão em função da amplitude, $\sigma^0(\omega)$, da tensão e do ângulo de fase, $\delta(\omega)$, entre a tensão e a deformação:

$$\sigma = \sigma^0 \sin(\omega t + \delta) = \sigma^0 \cos \delta \sin \omega t + \sigma^0 \sin \delta \cos \omega t \quad (2.5)$$

Comparando as equações (2.4) e (2.5) verifica-se que:

$$G' = (\sigma^o / \gamma^o) \cos \delta \quad (2.6)$$

$$G'' = (\sigma^o / \gamma^o) \sin \delta \quad (2.7)$$

$$\operatorname{tg} \delta = G' / G'' \quad (2.8)$$

Cada teste reológico dinâmico a uma determinada frequência fornece, simultaneamente, duas quantidades independentes, G' e G'' ou G' e $\operatorname{tg} \delta$.

É comum o emprego do módulo complexo, G^* , definido por:

$$G^* = G' + iG'' \quad (2.9)$$

$$|G^*| = \sigma^o / \gamma^o = \sqrt{(G'^2 + G''^2)} \quad (2.10)$$

O módulo complexo, G^* , representa a resistência total de uma substância em relação à deformação aplicada.

O módulo de armazenamento, G' , é assim denominado por ser diretamente proporcional à energia armazenada em um ciclo de deformação, isto é, está associado à resposta elástica do material. O módulo de dissipação, G'' , é diretamente proporcional à dissipação de energia (na forma de calor) em um ciclo de deformação e, portanto, está associado à resposta viscosa do material.

Se uma substância é puramente viscosa, então o ângulo de defasagem δ é 90° :

$$G' = 0 \text{ e } G'' = G^*$$

Se a substância é puramente elástica, então o ângulo de defasagem δ é nulo:

$$G' = G^* \text{ e } G'' = 0$$

Alternativamente ao módulo complexo, pode-se definir uma viscosidade complexa, η^* :

$$\eta^* = \eta' + i\eta'' \quad (2.11)$$

$$|\eta^*| = |G^*|/\omega = \tau^o/\gamma^o\omega = \sqrt{(\eta'^2 + \eta''^2)} \quad (2.12)$$

A viscosidade complexa representa a resistência total ao cisalhamento e suas componentes η' , denominada viscosidade dinâmica e η'' , denominada elasticidade, relacionam-se aos módulos de armazenamento e dissipação de acordo com as equações abaixo:

$$\eta' = G''/\omega \quad (2.13)$$

$$\eta'' = G'/\omega \quad (2.14)$$

A determinação da grandeza relativa dos parâmetros G' e G'' , obtidos em testes reológicos dinâmicos em função da frequência, da temperatura ou da composição, é de grande importância quando se está interessado em conhecer aspectos relacionados à estrutura do material, uma vez que é possível determinar sob que condições o mesmo exhibe, ou não, interações a nível molecular que lhe conferem uma estrutura mais elástica ou menos viscosa.

Existem vários trabalhos publicados (ROCHEFORT & MIDDLEMAN, 1987; HAMANN et alii, 1990; TAYLOR & FRYER, 1992; HUNG & SMITH, 1993) que procuram caracterizar a estrutura de materiais alimentícios através de medidas reológicas dinâmicas. O gel resultante do congelamento da gema de ovo ainda não foi objeto desse tipo de estudo e, assim, neste trabalho, esta metodologia foi utilizada na tentativa de contribuir para a determinação da estrutura do material.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima

Em todo o desenvolvimento experimental foram empregados ovos fornecidos pela empresa Ito Avicultura Ind. e Com. S.A., através de sua granja situada no município de Hortolândia - SP. Estes ovos foram utilizados em um período máximo de 24 horas após a postura. Procurou-se, com isso, garantir uma matéria-prima com características constantes ao longo do trabalho.

Como parâmetro de controle da matéria-prima foi adotado o teor de sólidos totais da gema, que varia em função do tempo de postura. Todas as amostras ensaiadas apresentaram teor de sólidos totais em torno de $(52,3 \pm 0,5) \%$.

3.1.1. Determinação do Teor de Sólidos Totais

O teor de sólidos totais foi determinado indiretamente, por subtração do conteúdo de umidade.

O conteúdo de umidade foi medido em estufa, a 105°C - 110°C por 12 horas (STADELMAN & COTTERILL, 1986). Antes da secagem, as amostras eram misturadas com areia (tratada e seca) para evitar a formação de crostas impermeáveis ao vapor de água.

3.2. Preparação das Amostras

A preparação das amostras de gema líquida foi realizada de acordo com o procedimento descrito por POWRIE et alii (1963): as gemas eram separadas manualmente das claras e lavadas em água corrente para eliminar todo o albume aderido em sua superfície. Em seguida, eram forçadas a rolar sobre folhas de papel absorvente para serem secas. A membrana vitelínica era cuidadosamente rompida, de

forma a liberar o conteúdo de seu interior em um béquer, onde o material recolhido era suavemente agitado com um bastão de vidro, resultando em um líquido homogêneo.

3.2.1. Adição de Crio-protetores

Para estudar a ação de crio-protetores sobre a gelificação da gema foram selecionados os seguintes aditivos: sacarose (marca Ecibra, grau P.A.), glicerol, NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (marca Reagen, grau P.A.).

A adição destas substâncias foi feita diretamente à gema líquida, em concentrações variáveis, na faixa de 2 a 10% com base no peso da gema.

Quando posta em contato com os cloretos de sódio, potássio e cálcio, a gema tornava-se muito viscosa, dificultando a dissolução dos mesmos e incorporando muito ar devido à agitação necessária. Para solucionar este problema, adotou-se um procedimento padrão para a adição dos crio-protetores, o qual foi aplicado a todas as amostras desta pesquisa, mesmo às de gema pura. A quantidade adequada do aditivo era misturada à gema sob agitação manual e, para facilitar a sua dissolução, a mistura era mantida em um banho ultrassônico (Thorton, modelo T 14) por 15 minutos. Finalmente, para eliminar o ar incorporado, a gema era aquecida em um banho termostático (Tecnal) até 35 °C e, em seguida, centrifugada (centrífuga MLW, modelo T 62) por 5 minutos a 4500 rpm.

3.3. Congelamento

As amostras eram congeladas em envelopes retangulares, confeccionados em um filme flexível, composto de poliéster, alumínio e polietileno, de gramatura igual a 66 g/m², com as bordas termoseladas. Cada envelope media 9 x 15 cm, tendo capacidade para aproximadamente 50 gramas e, quando cheios e colocados na posição horizontal, adquiriam o formato de uma placa delgada, com espessura em torno de 0,5 cm.

Os envelopes eram imersos em um banho refrigerado (Haake, modelo F3-K) contendo etanol. A temperatura era controlada com precisão de $\pm 0,3$ °C. O instante de imersão da amostra correspondia ao tempo zero de estocagem.

Para a realização de um ensaio de congelamento rápido, foi utilizada uma mistura de etanol e gelo seco, que mantém a temperatura em -78 °C.

O descongelamento foi efetuado em um banho termostático (Tecnal) a 20 °C, onde as amostras permaneciam por 20 minutos.

Como os intervalos de tempo considerados no armazenamento a baixas temperaturas referem-se ao momento da imersão da amostra, era importante saber qual o tempo necessário para o efetivo congelamento da mesma. O monitoramento da temperatura no centro térmico de todas as amostras ensaiadas neste trabalho teria sido inviável. Entretanto, foram realizados dois testes, com o objetivo de estimar este tempo. Amostras de gema pura foram colocadas nos envelopes utilizados para o congelamento e um termopar foi inserido em seu interior. No primeiro teste o meio refrigerante foi mantido a -12 °C e no segundo a -18 °C. Os resultados (Figura 3.1) demonstraram que o período decorrido desde a imersão da amostra até que a diferença entre a temperatura de seu centro térmico e a temperatura do meio refrigerante fosse inferior a 0,5% era relativamente curto (27 minutos para -18 °C e 34 minutos para -12 °C), tendo em vista os tempos totais de armazenamento.

3.4. Reologia

A determinação das propriedades viscoelásticas das amostras foi efetuada através de ensaios reológicos oscilatórios, empregando um reômetro Vilastic 3 (Viscoelasticity Analyzer), computadorizado, pertencente ao Laboratório de Engenharia de Petróleo (FEM/UNICAMP).

O princípio de funcionamento do reômetro Vilastic é baseado no deslocamento do fluido no interior de um tubo cilíndrico submetido a um gradiente de pressão oscilatório imposto pelo movimento de um pistão. Este movimento é

transmitido ao fluido por meio de uma membrana flexível. A frequência e a amplitude de oscilação são mantidas nos valores desejados pelo sistema eletrônico de acionamento do pistão. A medida da queda de pressão através do comprimento do tubo é usada para calcular a tensão de cisalhamento na parede do tubo, enquanto que o fluxo volumétrico é usado para calcular a taxa de deformação no mesmo ponto. Os módulos e as fases da queda de pressão e do fluxo volumétrico são utilizados para obter os componentes da tensão de cisalhamento em fase e defasados de 90° em relação à taxa de deformação na parede do tubo. Dessa forma os efeitos elásticos e viscosos são separados e os módulos viscoelásticos são calculados.

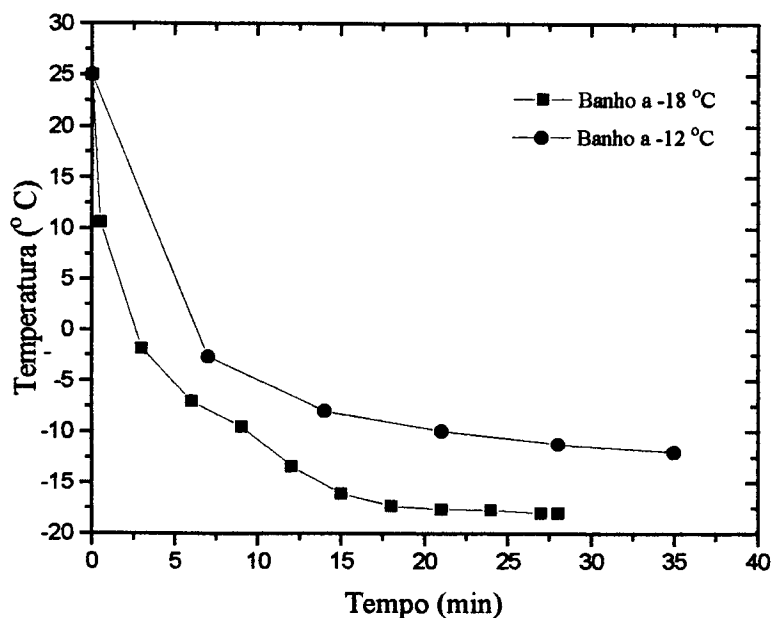


Figura 3.1 - Evolução da temperatura no centro térmico da amostra em função do tempo de imersão no meio refrigerante.

Os ensaios são controlados por um computador, que envia ao instrumento de medida uma sequência temporal de frequências e amplitudes. Os sinais de pressão e fluxo são realimentados ao computador, onde os dados são processados.

Foram necessários diversos testes preliminares para o estabelecimento da frequência de oscilação, f , e máxima deformação, γ , para a determinação dos

parâmetros reológicos, satisfazendo a dois critérios principais. O primeiro diz respeito à sensibilidade do reômetro. Por se tratar de um equipamento controlado por computador, após cada medida o programa de aquisição de dados emite um "diagnóstico" sobre a confiabilidade dos resultados, com base na flutuação dos sinais enviados pelo instrumento. Esse "diagnóstico" é acompanhado pela indicação de possíveis fontes de erro, entre as quais encontra-se o uso de um tubo com diâmetro inadequado às características da amostra. O reômetro dispõe de quatro tubos, com diâmetros na faixa de 0,1 a 0,3 cm, sendo os de maior diâmetro mais adequados a amostras de maior viscosidade. Em se tratando das amostras empregadas neste trabalho, foi necessário adotar o maior tubo disponível ($\phi = 0,3$ cm e $L = 6,63$ cm) para garantir a sensibilidade do instrumento.

O estabelecimento da frequência de 0,1 Hz para todas as medidas também seguiu o critério exposto acima. Duas amostras, uma de gema fresca (mais fluida) e uma de gema congelada/descongelada (gelificada) foram submetidas a uma varredura em função da frequência e observou-se que a faixa de frequências aceitável para a gema gelificada era de 0,01 (que é a frequência mínima permitida pelo instrumento) a 3 Hz. A utilização de maiores frequências sem prejuízo da confiabilidade dos resultados exigiria um tubo de maior diâmetro, o qual não existia. Dessa forma, mesmo que para a gema fresca não houvesse problemas em trabalhar em patamares mais elevados, adotou-se a frequência de 0,1 Hz para permitir a comparação dos módulos G' e G'' de todas as amostras.

Segundo o Manual de Operação do Vilastic 3, o diagnóstico das medidas será negativo quando forem ultrapassados os limites de operação dos sensores do instrumento, forem ultrapassados os limites teóricos impostos às condições de escoamento no tubo ou forem ultrapassados os limites de precisão na resolução de fase da viscoelasticidade. Não existem limites específicos para os valores dos parâmetros reológicos que podem ser medidos pelo equipamento. Em relação a um fluido puramente viscoso e empregando-se o tubo de 0,3 cm de diâmetro, o Manual de Operação indica que o máximo valor de G'' , para a frequência de 0,1 Hz, que pode ser

medido com segurança é de cerca de 460 Pa. Entretanto, esse limite é reduzido à medida que aumenta a magnitude da componente elástica do fluido.

Um problema adicional que ocorria quando a amostra encontrava-se muito gelificada, era a dificuldade de introduzi-la no tubo de medida mantendo a sua continuidade e sem bolhas de ar.

Para a escolha da amplitude adequada, o critério a ser satisfeito era a manutenção do comportamento de viscoelasticidade linear dos materiais testados. Com esse objetivo, as amostras de gema fresca e congelada/descongelada foram ensaiadas em função da deformação com a frequência fixa em 0,1 Hz. As curvas de tensão de cisalhamento versus deformação (apresentadas nas Figuras 3.2 e 3.3) foram analisadas, observando-se que acima de $\gamma = 0,5$ para a gema fresca e de $\gamma = 0,1$ para a gema gelificada o comportamento linear deixava de existir.

Durante os testes reológicos, a temperatura das amostras foi mantida em $24 \pm 0,5$ °C.

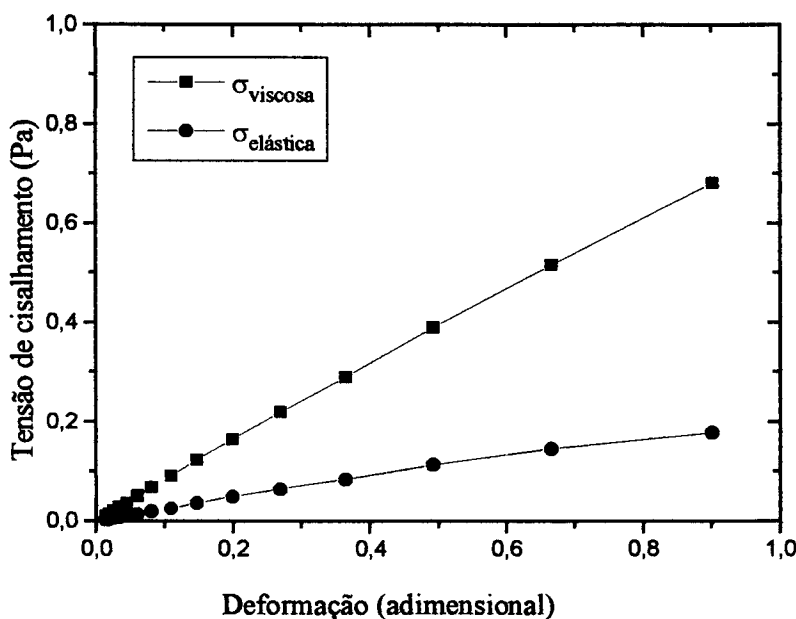


Figura 3.2 - Tensão de cisalhamento versus deformação para gema em estado nativo.

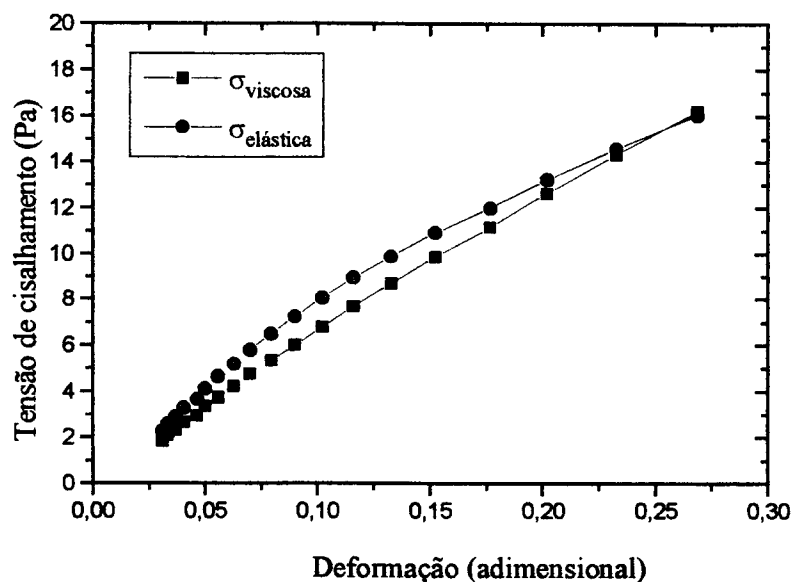


Figura 3.3 - Tensão de cisalhamento versus deformação para gema congelada/descongelada a -20 °C por 24 hs.

3.5. Microscopia Óptica

Gotas de gema submetida a diferentes tratamentos foram colocadas sobre lâminas e cobertas por lamínulas. As lâminas foram ajustadas ao microscópio para serem observadas e fotografadas. O microscópio utilizado é da marca Carl Zeiss (modelo Jenamed) com câmara fotográfica acoplada. O aumento empregado foi de 1000x e em todas as observações foi usado um filtro de cor verde.

3.6. Calorimetria Diferencial de Varredura

Os ensaios calorimétricos foram realizados em um calorímetro diferencial de varredura Du Pont, modelo 910, computadorizado, pertencente ao Laboratório de Análise Térmica (IQ/UNICAMP).

As análises calorimétricas foram efetuadas nas seguintes condições: congelamento rápido até -50 °C com nitrogênio líquido e, a partir daí, aquecimento a uma taxa de 5 °C/min até 100 °C. Como referência foi empregada uma cápsula vazia.

3.7. Temperatura de Início de Congelamento

As amostras foram colocadas em um pequeno tubo de ensaio, com capacidade para 5 ml, contendo um termopar, conectado a um indicador de temperatura (Cole-Parmer, modelo 8536-25). Este tubo era imerso em um banho refrigerado (Haake, modelo F3-K), com temperatura constante. A partir do momento da imersão, a temperatura da amostra era registrada a intervalos de tempo regulares (10 segundos). O ponto de início de congelamento é caracterizado por um platô na curva temperatura versus tempo. A temperatura do banho era ajustada em torno de 5 a 10 °C abaixo da temperatura de início de congelamento, de forma que o platô ficasse melhor definido. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

A Figura 3.4 apresenta curvas típicas para determinação do ponto de início de congelamento, obtidas para gema com 2% de NaCl. Cada uma das curvas representa uma repetição completa do procedimento de medida, empregando-se diferentes temperaturas do banho refrigerado. É possível observar claramente a ocorrência de super-resfriamento, seguida da estabilização da temperatura em um patamar mais elevado durante alguns segundos, caracterizando o início da formação de gelo e a consequente liberação de calor. A diferença entre o tempo em que as amostras permanecem super-resfriadas nos ensaios a -17 °C deve-se ao fato de que qualquer perturbação na amostra durante esse período era suficiente para desencadear o processo de cristalização, o que deve ter ocorrido naquela que permaneceu super-resfriada durante um tempo menor.

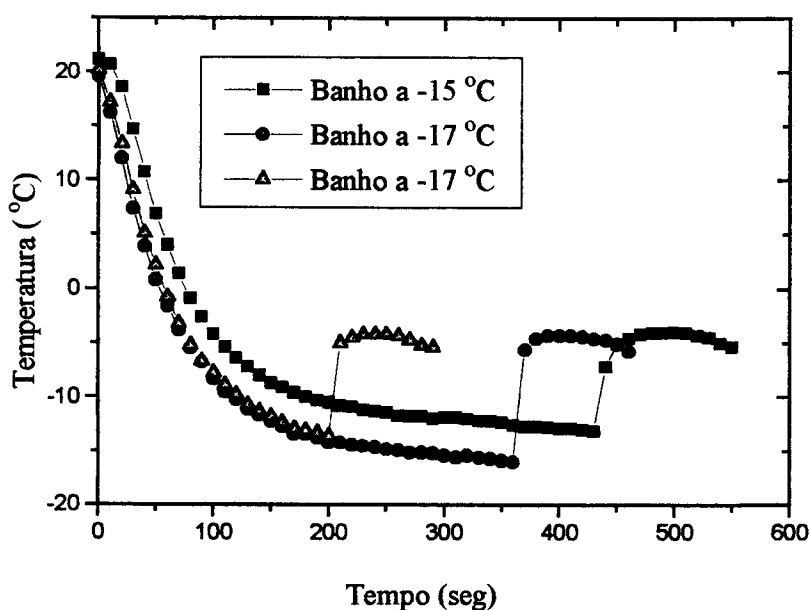


Figura 3.4 - Curvas de temperatura em função do tempo para gema com 2% de NaCl.

3.8. Determinação da Entalpia e Fração de Água Congelada

A entalpia da gema pura e com aditivos foi determinada pelo método do calorímetro de mistura, já empregado com sucesso por HENSE (1990). Esse método baseia-se na adição de uma quantidade conhecida de amostra, previamente equilibrada na temperatura desejada, a uma determinada massa de água, cuja temperatura também é conhecida, no interior de um recipiente isolado termicamente. Após a temperatura no interior do recipiente atingir o equilíbrio, procede-se a um balanço de energia.

O calorímetro empregado consistia em um garrafa térmica (frasco Dewar), em cuja tampa foi inserido um termopar conectado a um indicador de temperatura (Cole-Parmer, modelo 8536-25).

Ao iniciar o experimento, o frasco Dewar era seco e pesado. Colocava-se então cerca de 100 ml de água e pesava-se novamente, obtendo-se, por diferença, o peso da água (m_w). Através do termopar media-se a temperatura inicial da água (T_0). A

amostra congelada era, então, introduzida no frasco e todo o conteúdo agitado até a estabilização da temperatura (T_f).

As amostras eram congeladas em pequenos envelopes retangulares (3 cm x 6 cm), confeccionados em um filme flexível, composto de poliéster, alumínio e polietileno, de gramatura igual a 66 g/m², com as bordas termoseladas. Antes do congelamento, cada embalagem era pesada (m_e) e em seguida introduzia-se cerca de 5 g de gema. Após ter sido selada, a embalagem cheia era novamente pesada, obtendo-se a massa da amostra (m_p)

Como era impossível retirar a embalagem antes da introdução no calorímetro, efetuou-se uma correção em relação à quantidade de calor absorvida pela embalagem, considerando-se um calor específico médio ponderado (C_{pe}) entre o poliéster (16 g/m², $C_p = 0,13$ cal/g °C) e o polietileno (50 g/m², $C_p = 0,55$ cal/g °C) igual a 0,45 cal/g °C. O alumínio não foi considerado por estar presente em quantidade muito pequena.

A temperatura inicial das amostras (T_p) correspondia à temperatura do banho termostático, onde as mesmas permaneciam por um período (4 horas) suficiente para atingir o equilíbrio.

A variação total da entalpia da amostra (ΔH_p) era calculada por meio do seguinte balanço:

$$m_p \Delta H_p = m_w C_{pw}(T_0 - T_f) - m_e C_{pe}(T_f - T_p) + q_c \quad (3.1)$$

onde q_c corresponde à capacidade térmica do calorímetro no intervalo de temperaturas da água, determinada previamente através de uma curva de calibração, obtida segundo o procedimento descrito por KLEEGERG (1986).

Devido à presença de uma alta proporção de lipídios na gema de ovo, cujo ponto de fusão situa-se em torno de 10 °C (ver Anexo A, onde são apresentados os dados de RIEDEL, 1957), foi preciso garantir que as amostras não ultrapassassem a temperatura de 5 °C durante as determinações de variação de entalpia pois, do contrário, além do calor latente da água, seria contabilizado o calor latente desses

lipídios. Portanto, a temperatura da água introduzida no calorímetro no início de cada ensaio (T_0) era de cerca de 4 °C.

Para minimizar os erros envolvidos, a calibração do calorímetro foi realizada na mesma faixa de temperaturas utilizadas durante os experimentos.

O valor de ΔH_p calculado pela equação 3.1 corresponde à variação de entalpia desde a temperatura inicial da amostra (temperatura do banho termostático) até a temperatura de equilíbrio no calorímetro (T_f). Contudo, é conveniente expressar a variação de entalpia relativamente a um valor de referência. Neste trabalho, de acordo com a recomendação de SHWARTZBERG (1981), considerou-se como referência ($H = 0$) o produto não-congelado na temperatura de início de congelamento (T_{ic}). Assim, para calcular a entalpia do produto na sua temperatura inicial, é preciso descontar o calor sensível recebido acima de seu ponto de congelamento, o que foi feito através da seguinte equação:

$$H_p = \Delta H_p - C_{p_p}(T_f - T_{ic}) \quad (3.2)$$

onde

H_p = entalpia da gema, referida a T_{ic}

C_{p_p} = calor específico da gema na faixa de temperaturas de T_{ic} a T_f

Considerando que o estado de referência para a determinação da entalpia é o produto não congelado na temperatura T_{ic} , o valor H_p é composto de duas parcelas: uma correspondente ao calor sensível recebido no intervalo entre a temperatura inicial da amostra e a temperatura de início de congelamento e outra correspondente ao calor latente de fusão do gelo. Portanto, para calcular a fração de água congelada é necessário, ainda, subtrair a parcela do calor sensível, de acordo com a equação:

$$H_{lat} = H_p - C_{p_c}(T_{ic} - T_p) \quad (3.3)$$

onde

H_{lat} = calor latente de fusão do gelo na amostra

C_{p_c} = calor específico do produto congelado, na faixa de temperaturas entre T_{ic} e T_p

Finalmente, do valor de H_{lat} , subtraiu-se o calor latente de fusão de alguns lipídios cuja transição de fases ocorre abaixo de 4 °C. O cálculo do calor latente de fusão dos lipídios foi feito pela integração da curva de C_p versus temperatura para gema com 0% de umidade (dados de RIEDEL, 1957, no Anexo A) na faixa de temperaturas de interesse.

A fração de água congelada era, então, calculada segundo a relação abaixo:

$$n_p = \frac{H_{lat}}{79,2(\%UBU/100)} \quad (3.4)$$

onde a constante 79,2 corresponde ao calor latente de fusão da água pura (em kcal/kg) e

%UBU = porcentagem de umidade da amostra, em base úmida..

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este Capítulo foi dividido em 5 (cinco) seções principais, com o objetivo de dar maior clareza aos resultados e facilitar a discussão dos mesmos. A primeira seção trata do estudo da estrutura dos géis formados e da cinética de gelificação em função da presença de aditivos, velocidade de congelamento, tempo e temperatura de estocagem. Na seção 4.2 encontram-se os resultados de calorimetria diferencial de varredura, por meio dos quais foram determinadas as temperaturas de transição vítrea. Em seguida, são apresentadas as temperaturas de início de congelamento da gema em função do tipo e concentração de aditivos, bem como as frações de água congelada, determinadas em um calorímetro de mistura. O Capítulo é encerrado com os resultados de microscopia óptica de amostras de gema antes e após o congelamento e com ou sem aditivos.

4.1. Estudo da Gelificação Empregando Medidas Reológicas

4.1.1. Estrutura dos Géis Formados Durante o Congelamento

Como já foi mencionado na seção 2.3, um material viscoelástico, quando submetido a uma deformação, levará algum tempo para adquirir uma nova configuração, isto é, será necessário um intervalo de tempo finito para que ele “esqueça” sua forma anterior. A resposta de uma substância viscoelástica a uma situação particular depende de sua velocidade de reorganização estrutural espontânea a nível molecular. Nos líquidos, os arranjos moleculares locais sofrem relaxação rápida pela ação do movimento Browniano. A “memória” estrutural é muito curta e as alterações nas distâncias entre as moléculas induzidas pela deformação são rapidamente relaxadas (existe uma acomodação), de forma que a resposta é essencialmente viscosa, exceto quando a velocidade do experimento é muito alta. Por outro lado, nos sólidos a relaxação da estrutura é extremamente lenta. A “memória”

estrutural é muito longa, tornando a resposta essencialmente elástica. Uma característica que diferencia os sistemas poliméricos destes dois casos extremos é a grande faixa de tempos de relaxação apresentadas pelos mesmos.

O espalhamento dos tempos de relaxação em uma faixa de várias ordens de grandeza é uma consequência natural da estrutura macromolecular e a observação do gráfico do módulo de relaxação em função do tempo para um determinado polímero revela a existência de certas regiões características, ilustradas na Figura 4.1. Gráficos como esse podem ser obtidos em experimentos do tipo “stress relaxation”, em que um cisalhamento constante é aplicado instantaneamente (no tempo zero) e a tensão é monitorada ao longo do tempo subsequente. Desde que a tensão aplicada seja pequena o suficiente para que a resposta esteja nos limites da viscoelasticidade linear, a razão entre a tensão e a deformação é função apenas do tempo e é denominada módulo de relaxação da tensão, $G(t)$. A deformação faz com que as cadeias poliméricas adquiram configurações distorcidas. Em tempos muito curtos a resposta é característica do estado vítreo. O módulo é grande (da ordem de 10^{10} Pa). Ele cai rapidamente, à medida que as cadeias relaxam localmente, e progressivamente, quando a relaxação se dá ao longo de distâncias maiores. Quando as cadeias são curtas (baixo peso molecular) o módulo de relaxação tende suavemente a zero. Para cadeias longas, a velocidade de relaxação é retardada e o módulo permanece relativamente constante durante um certo período antes de sofrer uma rápida redução até zero.

Uma alternativa aos experimentos de “stress relaxation” são os ensaios de deformação oscilatória, utilizados neste trabalho. Um experimento dinâmico ou periódico a uma frequência de oscilação ω equivale, qualitativamente, a um experimento transiente no tempo $t = 1/\omega$. Nesse caso, é usual a representação dos resultados em termos da evolução dos módulos de dissipação (G'') e armazenamento (G') em função da frequência ω . A Figura 4.2 ilustra o comportamento típico de polímeros de alto peso molecular. Em relação à curva de $G(t)$, a ordem de aparecimento das várias regiões é inversa. Baixas frequências correspondem a grandes intervalos de tempo e vice-versa.

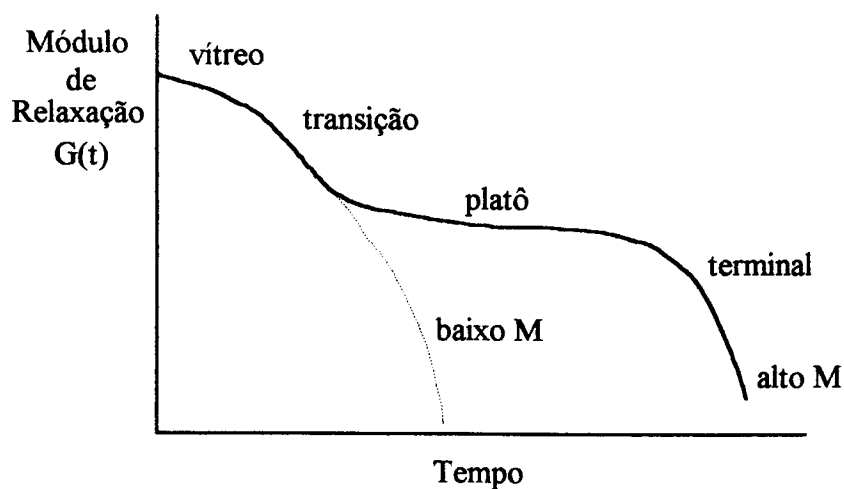


Figura 4.1 - Evolução do módulo de relaxação em um sistema polimérico (GRAESSLEY, 1984).

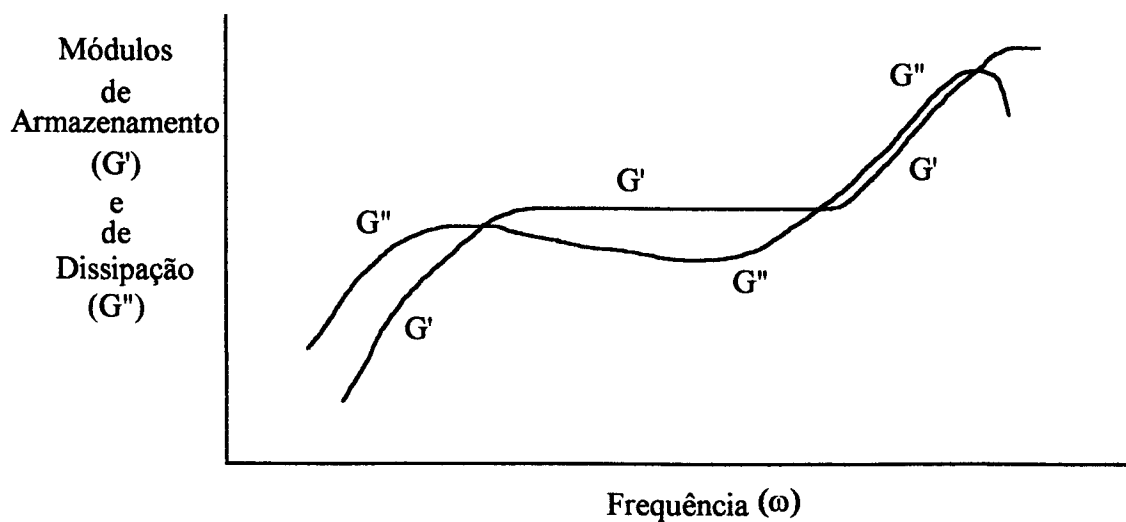


Figura 4.2 - Evolução dos módulos de armazenamento e dissipação em função da frequência para sistemas poliméricos (GRAESSLEY, 1984).

Em baixas frequências, ambos os módulos crescem com o aumento da frequência mas $G'(\omega)$ permanece sempre menor que $G''(\omega)$, isto é, a resposta viscosa domina, indicando que as cadeias moleculares podem se desentrelaçar e rearranjar-se durante o longo período de oscilação. Em frequências intermediárias G' torna-se maior que G'' , tornando-se relativamente constante, o que demonstra que os curtos períodos de oscilação não permitem o desentrelaçamento das moléculas. Nesse caso, os entrelaçamentos desempenham o papel de zonas de junção intermoleculares temporárias. Uma nova inversão nas magnitudes é observada na região de transição e finalmente, quando o estado vítreo é atingido, G'' diminui e G' torna-se predominante.

Estas regiões características podem ser associadas qualitativamente com diferentes tipos de respostas moleculares e aparecem com diferentes graus de definição e proeminência, dependendo se o polímero é de alto ou baixo peso molecular, amorfo ou cristalino, está acima ou abaixo da temperatura de transição vítrea, está concentrado ou diluído com solvente (GRAESSLEY, 1984; FERRY, 1980; MIYOSHI et alii, 1994).

Mesmo em sistemas complexos, que não se comportam exatamente como um polímero, mas que apresentam comportamento viscoelástico, como é o caso da gema de ovo submetida ao congelamento ou tratada com diferentes aditivos, é possível utilizar esse mesmo tipo de experimento com o objetivo de obter informações sobre a estrutura do gel formado.

Com base em seu comportamento reológico, existem os géis “fortes” ou géis “verdadeiros”, que apresentam ligações cruzadas permanentes de alta energia de ligação, e os sistemas em que as características elásticas são decorrentes da formação de emaranhados de natureza topológica entre suas moléculas. Esses últimos são soluções concentradas de macromoléculas que, em frequências maiores que o tempo de vida médio dos entrelaçamentos, podem ser considerados como géis mas, na realidade, são fluidos viscoelásticos. Os fluidos viscoelásticos apresentam uma forte dependência do módulo de armazenamento (G') em função da frequência, podendo até mesmo ocorrer o cruzamento das curvas de G' e G'' (módulo de dissipação). Por outro

lado, os géis fortes são muito pouco dependentes da frequência e são os que mais se aproximam dos géis covalentes, cujos módulos de armazenamento e dissipação são completamente independentes da frequência.

Existe ainda, uma classe de géis intermediários, que são dependentes da frequência mas não apresentam o cruzamento das curvas de G' e G'' . Esse tipo de gel é frequentemente denominado gel “físico” ou gel “fraco”, em contraste ao gel covalente (STADING & HERMANSSON, 1990).

A Figura 4.3 apresenta os módulos de armazenamento e dissipação em função da frequência para a gema pura congelada a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 22 horas. Nesta seção, todos os resultados referem-se a ensaios de congelamento lento, isto é, as amostras em temperatura ambiente foram colocadas diretamente no banho com temperatura igual à temperatura de estocagem. O momento de imersão da amostra corresponde ao tempo zero de estocagem.

O primeiro ponto importante é que G'' é maior que G' sobre toda a faixa de frequências explorada. Isso indica que, nessas condições, o comportamento reológico da gema é predominantemente viscoso e não pode ser considerado como um gel.

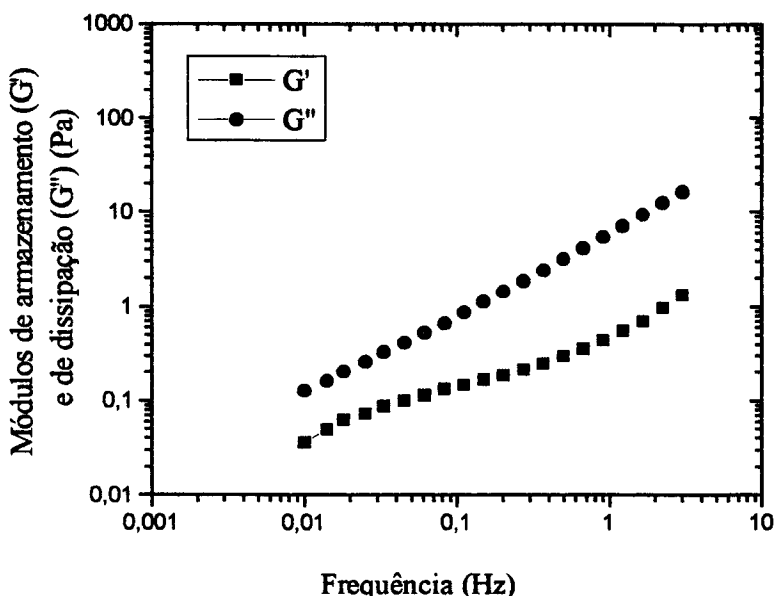


Figura 4.3 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema pura congelada a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 22 horas.

Quando a temperatura de congelamento passa de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, ocorre o inverso, como mostram as Figuras 4.4 e 4.5, para gema pura congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 17 e 22 horas, respectivamente. Nessas amostras o módulo de armazenamento é superior ao módulo de dissipação em toda a extensão das curvas, explicitando a existência de uma estrutura do tipo gel. Observa-se que não ocorre o cruzamento das curvas de G' e G'' , embora exista uma certa dependência em relação à frequência de oscilação. Essas são características de géis físicos, onde não existem ligações covalentes.

MIYOSHI et alii (1994), em um estudo sobre o comportamento de soluções de goma gelana, lançam a hipótese de que as propriedades dos géis físicos sejam devidas a associações laterais entre sequências de cadeias de conformação ordenada, análogas as zonas de junção dos géis verdadeiros, mas de menor energia de ligação.

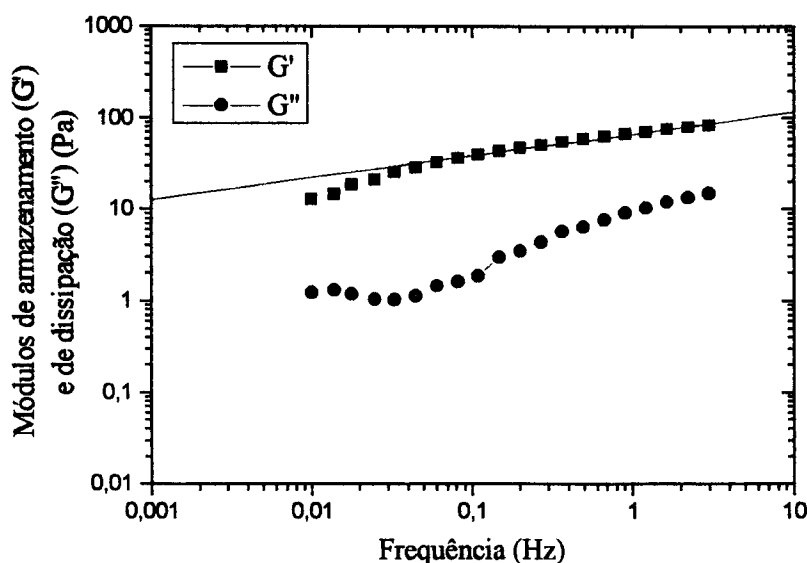


Figura 4.4 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema pura congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 17 horas.

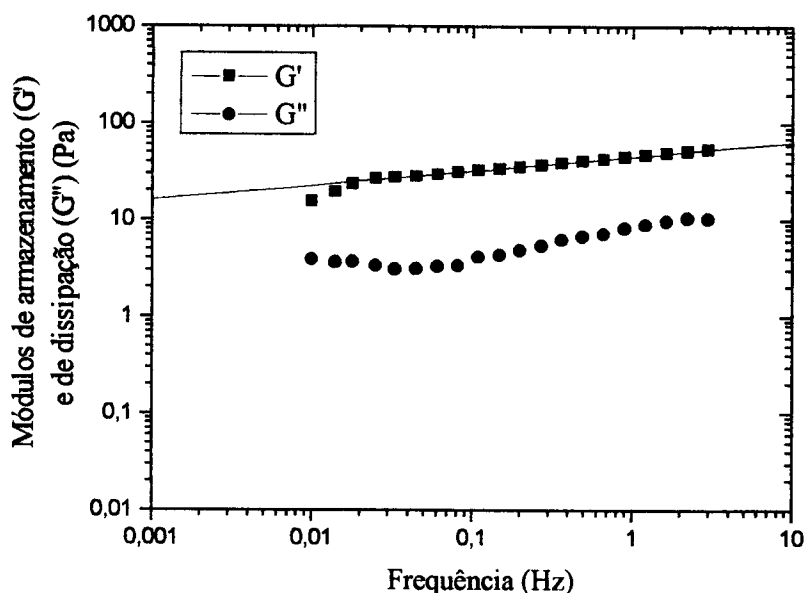


Figura 4.5 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema pura congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 22 horas.

Uma forma de expressar quantitativamente a dependência de G' em relação à frequência é através do parâmetro n , proposto por EGELANDSDAL et alii (1986), segundo o modelo:

$$\log G' = n \log f + K \quad (4.1)$$

onde K é uma constante e n é a inclinação da curva de G' versus a frequência de oscilação em coordenadas logarítmicas. Um gel covalente apresenta $n = 0$, enquanto um gel físico exhibe $n > 0$. A inclinação é, portanto, uma medida da similaridade entre o gel considerado e um gel covalente.

Considerando a parte linear da curva de G' na Figura 4.4 (indicada pela linha reta), o valor de n obtido é de 0,24. Repetindo o procedimento para os dados da Figura 4.5, o valor calculado para n é de 0,15. Isso demonstra que à medida que aumenta o tempo de armazenamento da gema a baixa temperatura, o módulo de

armazenamento do gel formado torna-se menos dependente da frequência, isto é, sua estrutura apresenta-se mais fortalecida, embora suas características ainda sejam as de um gel físico, sem ligações covalentes.

Ainda nas Figuras 4.4 e 4.5, é possível observar que as curvas do módulo de armazenamento apresentam duas regiões distintas, podendo ser caracterizadas por duas inclinações: uma mais acentuada em frequências baixas e outra, mais suave, em frequências maiores. Esse comportamento também foi observado por STADING et alii (1992) em géis de β -lactoglobulina e atribuído à presença de heterogeneidades na estrutura do material. Segundo esses autores, as regiões com maior ou menor densidade molecular possuiriam tempos de relaxação diferentes, causando a “quebra” das curvas do módulo de armazenamento. É interessante verificar que para a gema congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 17 horas (Figura 4.4) a região inicial, de maior inclinação da curva de G' , é maior que para a gema mantida a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 22 horas (Figura 4.5). Isso pode ser tomado como uma indicação de que, ao longo do tempo em que permanece a baixa temperatura, o desenvolvimento da estrutura tridimensional na gema é contínuo, aumentando progressivamente a homogeneidade do gel.

Outro método conveniente de obter informações a respeito da microestrutura de um sistema, e que é rotineiramente usado no estudo de géis, é medir os módulos G' e G'' ao longo de uma varredura na deformação, mantendo a frequência de oscilação constante (em um valor suficientemente baixo para evitar efeitos não-lineares).

Na Figura 4.6 são apresentados os resultados obtidos com gema pura após o congelamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 23 horas. O módulo de dissipação é praticamente constante na faixa de frequências considerada, com exceção da região inicial da curva. Por outro lado, o módulo de armazenamento apresenta apenas uma estreita faixa onde permanece constante, seguida de um período de declínio onde chega, inclusive, a cruzar a curva de G'' . Esse comportamento, assim como os resultados da varredura em função da frequência, confirmam que a elasticidade da gema após o congelamento decorre da formação de agregados de partículas sólidas, sem ligações permanentes. Quando

submetidos a deformações maiores que um determinado valor ($\gamma > 0,05$ nesse caso), esses agregados começam a romper-se, reduzindo a elasticidade do material, que passa a ser predominantemente viscoso.

Pode-se assumir que o aumento de G' e G'' observado na parte inicial das curvas da Figura 4.6 seja causado por uma reorganização da estrutura logo após a amostra ter sido introduzida no capilar do reômetro, uma vez que isso é feito por sucção, causando cisalhamento no material.

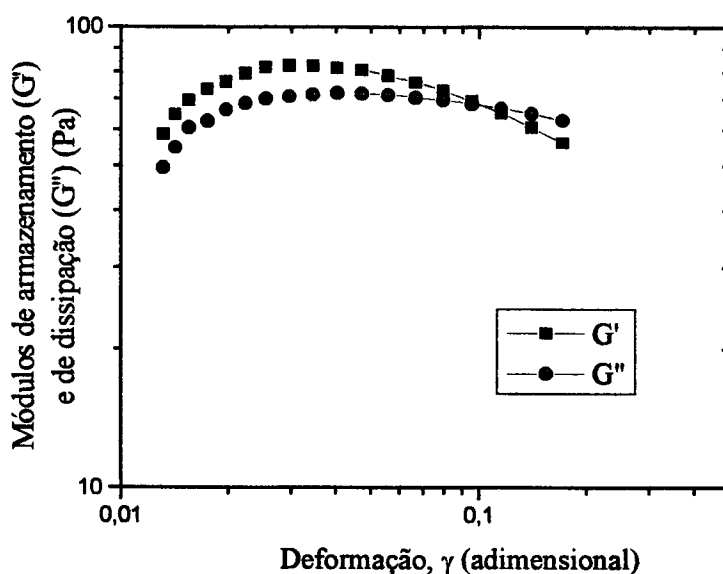


Figura 4.6 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da deformação da gema pura congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 23 horas.

A adição de NaCl à gema altera profundamente as características estruturais do material, como mostram as Figuras 4.7 a 4.10 para gema com 2 e 10% de sal, sem congelar e congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 e 22 horas, respectivamente.

Antes do congelamento (Figuras 4.7 e 4.9) as amostras apresentam respostas semelhantes, exibindo uma dependência bastante acentuada do módulo de

armazenamento em relação à frequência e o cruzamento das curvas de G' e G'' . Isso evidencia um comportamento típico de soluções concentradas de macromoléculas.

Segundo ROCHEFORT & MIDDLEMAN (1987), o cruzamento das curvas de G' e G'' em função da frequência indica o início da região elástica e, tipicamente, move-se para a direita (frequências maiores) à medida que as soluções tornam-se mais diluídas e a estrutura tridimensional desaparece. A Tabela 4.1 apresenta a frequência correspondente ao cruzamento das curvas de G' e G'' para a gema tratada com aditivos antes e depois do congelamento.

A frequência em que se dá o cruzamento das curvas de G' e G'' é aproximadamente igual para teores de 2 e 10% de NaCl não congeladas.

Após o congelamento (Figuras 4.8 e 4.10), o comportamento da gema com 2 e 10% de cloreto de sódio passa a ser bastante distinto. A amostra com 2% de NaCl tem comportamento análogo a um polímero de alto peso molecular na região de frequências intermediárias, correspondente ao início da região do “platô” na Figura 4.2, com o módulo de armazenamento praticamente constante acima de 0,04 Hz. Isso indica que o congelamento propiciou o desenvolvimento de interações intermoleculares antes inexistentes. O mesmo não aconteceu com a gema tratada com 10% de NaCl, que continuou apresentando uma dependência acentuada de ambos os módulos em relação à frequência.

A Figura 4.10 demonstra que a estrutura da gema com 10% de cloreto de sódio após o congelamento é menos organizada que a da gema pura (Figuras 4.3 a 4.5) submetida ao mesmo tratamento, podendo ser considerada como um fluido viscoelástico, com característica de gel apenas em frequências mais elevadas. Essa seria a razão pela qual atribui-se ao NaCl a capacidade de impedir a gelificação durante o congelamento. Comparando a gema com 10% de NaCl sem congelar e congelada (Figuras 4.9 e 4.10), pode-se concluir que o congelamento contribui para uma certa organização da estrutura, uma vez que a frequência em que ocorre o cruzamento dos módulos de armazenamento e dissipação cai de 1,3 para 0,14 Hz.

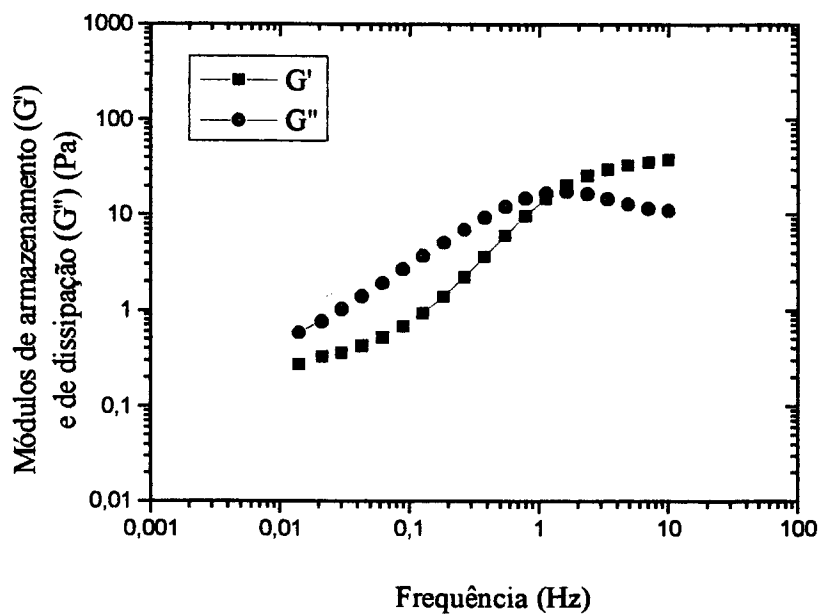


Figura 4.7 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de NaCl sem congelar.

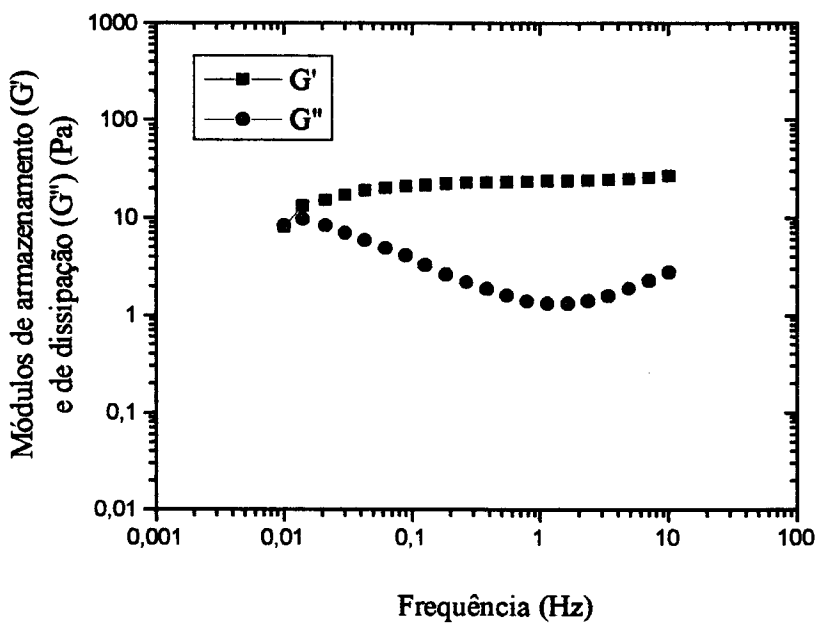


Figura 4.8 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de NaCl congelada a -24°C por 36 horas.

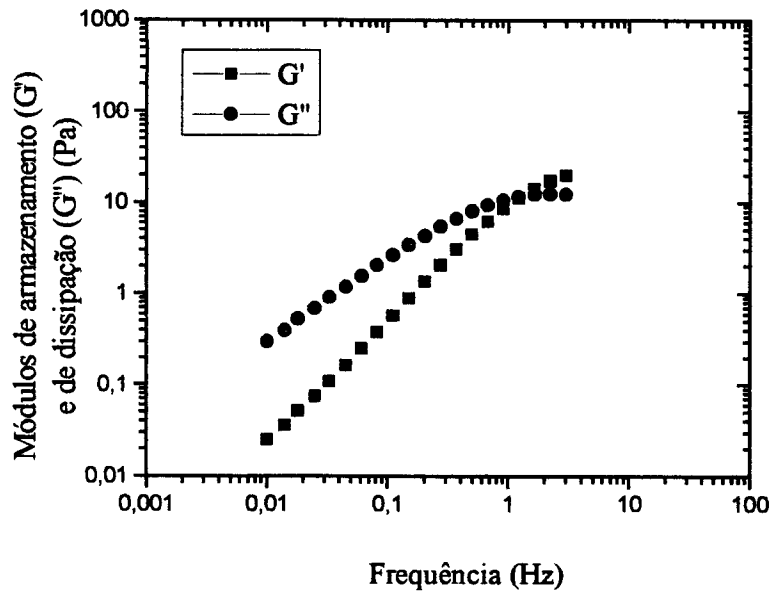


Figura 4.9 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de NaCl sem congelar.

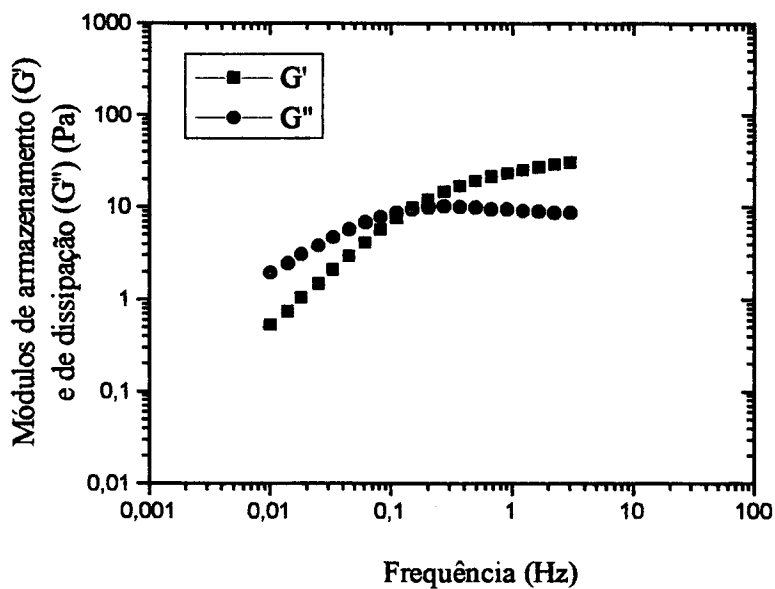


Figura 4.10 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de NaCl congelada a -24°C por 22 horas.

Tabela 4.1 - Frequências correspondentes ao cruzamento das curvas de G' e G'' para gema tratada com diferentes aditivos antes e depois do congelamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.

ADITIVO	% (PESO/PESO)	f (Hz) - ANTES DO CONGELAMENTO	f (Hz) - APÓS O CONGELAMENTO
Glicerol	2	7,7	0,28
Glicerol	10	-	4,3
Sacarose	2	7,8	0,035
Sacarose	10	6,3	1,4
NaCl	2	1,4	0,010
NaCl	10	1,3	0,14
KCl	2	1,4	-
KCl	10	0,38	-
MgCl ₂	2	2,9	0,014
MgCl ₂	10	7,6	5,6
CaCl ₂	2	0,32	-
CaCl ₂	10	-	-

Uma possível explicação para o comportamento da gema após a adição de NaCl seria baseada nos efeitos eletrostáticos induzidos no sistema pela introdução dos íons Na^+ e Cl^- . Quando as partículas em uma suspensão diluída são carregadas eletricamente, uma dupla camada elétrica de íons forma-se ao redor de cada partícula. Em sistemas concentrados, as duplas camadas podem interagir ou sobrepor-se e o efeito repulsivo pode causar um aumento na viscosidade (BARBUT & MITTAL, 1988).

Assim, o comportamento de solução concentrada, com o aumento dos módulos G' e G'' e o cruzamento das curvas poderia ser consequência de efeitos dessa natureza. O congelamento agiria no sentido de anular as forças repulsivas, através da diminuição do volume livre pela formação de cristais de gelo. Após vencida uma distância crítica, as partículas desenvolveriam ligações de outra natureza, com maior tempo de relaxação, causando a predominância do módulo de armazenamento sobre todo o espectro de frequência, observável na Figura 4.8 para a gema congelada com 2% de NaCl.

Também não se deve excluir a hipótese de alguma participação do íon Na^+ nas interações intermoleculares surgidas após o congelamento, uma vez que é possível

observar que a dependência de G' da gema congelada com 2% de NaCl em função da frequência é menor que para a gema pura submetida a tratamento semelhante (Figuras 4.4 e 4.5).

O caráter menos elástico apresentado pela amostra congelada com 10% de NaCl seria devido à maior dificuldade de aproximação das moléculas em função da maior concentração de íons. Entretanto, como efeito colateral, o caráter viscoso da amostra é acentuado.

As Figuras 4.11 a 4.14 mostram o efeito da adição de sacarose à gema antes e depois do congelamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas. As amostras não submetidas ao congelamento apresentam um comportamento muito semelhante entre si, sendo os módulos de armazenamento e dissipação completamente dependentes da frequência, como na região inicial da Figura 4.2.

O aumento da concentração de sacarose de 2 para 10% provoca uma pequena diminuição na frequência correspondente ao cruzamento das curvas de G' e G'' . Com 2% de sacarose o cruzamento ocorre em $f = 7,8\text{ Hz}$ e com 10% em $f = 6,3\text{ Hz}$ (Tabela 4.1). Verifica-se que esses valores de frequência são bem maiores que os correspondentes à gema com NaCl, fazendo concluir que as interações entre moléculas induzidas pelo NaCl são diferentes daquelas induzidas pela sacarose. Estas últimas apresentam um tempo de relaxação menor, o que indica serem de menor alcance.

A análise das Figuras 4.12 e 4.14 revela que o efeito crio-protetor da sacarose é maior em relação ao do cloreto de sódio, embora não tenha capacidade de impedir completamente uma ordenação parcial das moléculas após o congelamento. Mesmo assim, quando o teor de sacarose é de apenas 2%, observa-se que a faixa de frequências onde a resposta elástica predomina é bem menor comparada à da gema com 2% de NaCl. O acréscimo da concentração de açúcar de 2 para 10% também é benéfico no sentido de impedir a gelificação. Na faixa de frequências analisadas, a gema congelada com 10% de sacarose não apresentou a região do platô e o módulo de armazenamento é superior ao de dissipação apenas em frequências maiores que 1,4 Hz, sendo o seu comportamento comparável ao de um fluido viscoelástico, sem a presença de interações moleculares de natureza permanente.

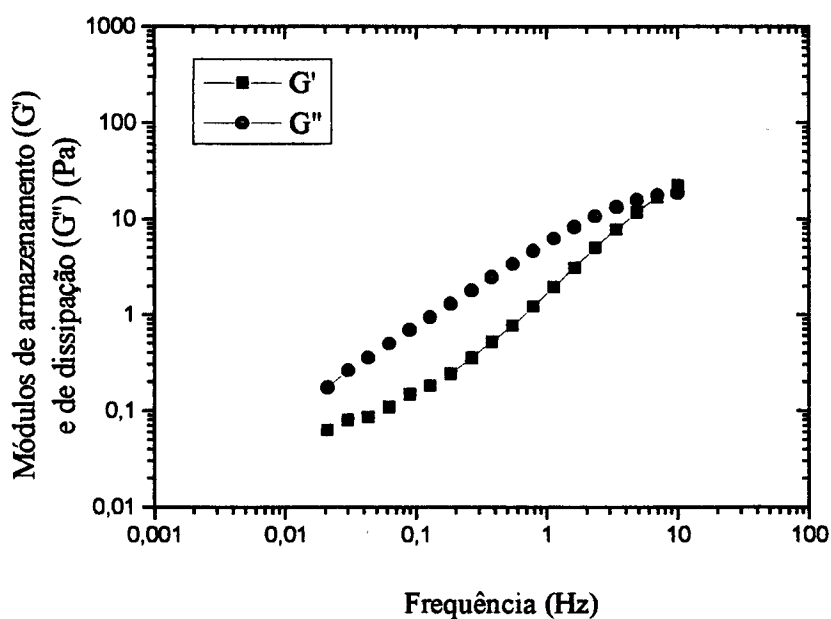


Figura 4.11 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de sacarose sem congelar.

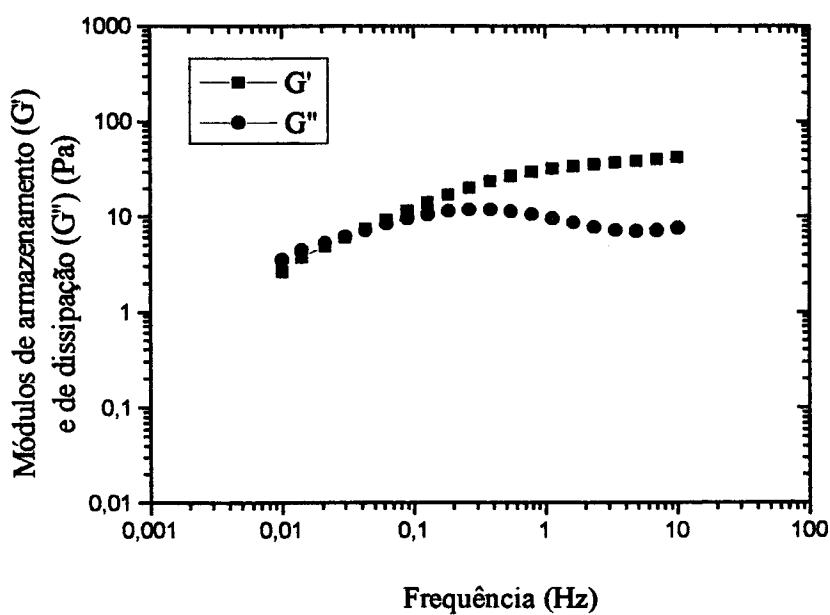


Figura 4.12 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de sacarose congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.

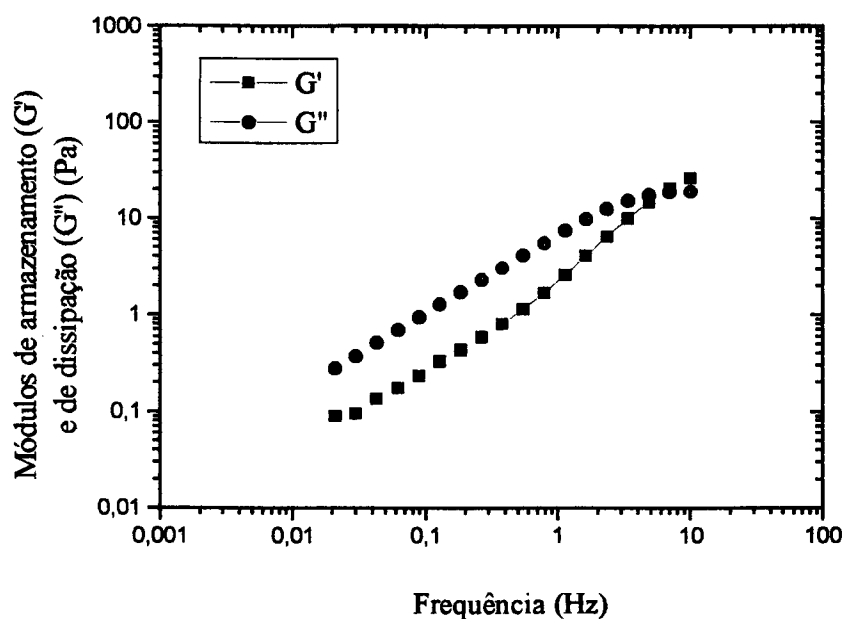


Figura 4.13 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de sacarose sem congelar.

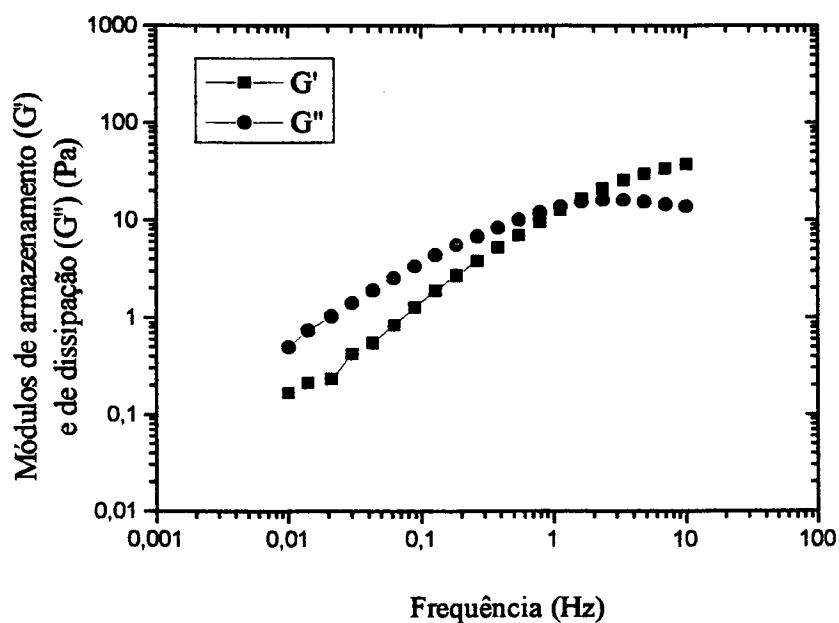


Figura 4.14 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de sacarose congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.

O efeito do glicerol sobre as propriedades reológicas da gema de ovo é muito semelhante ao da sacarose, como pode ser observado nas Figuras 4.15 a 4.18. Em todos os gráficos verifica-se uma dependência acentuada dos módulos de armazenamento e dissipação em função da frequência.

Entretanto, é evidente a tendência à ordenação das moléculas provocada pelo congelamento. Quando a concentração de glicerol empregada foi de 2%, a frequência correspondente ao cruzamento das curvas de G' e G'' caiu de 7,7 Hz para cerca de 0,28 Hz após o congelamento (Tabela 4.1), indicando o surgimento de estruturas com tempos de relaxação mais elevados. O aumento da concentração de glicerol para 10% causou um efeito de diluição na gema antes do congelamento, uma vez que G'' é maior que G' em toda a faixa de frequências estudada. Entretanto, após o congelamento, as curvas voltam a se cruzar por volta de $f = 4,3$ Hz.

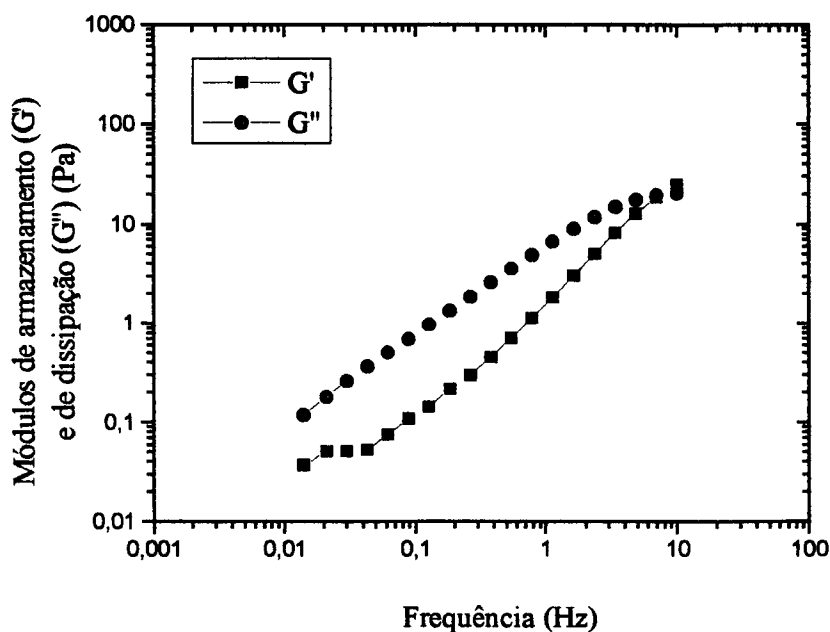


Figura 4.15 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de glicerol sem congelar.

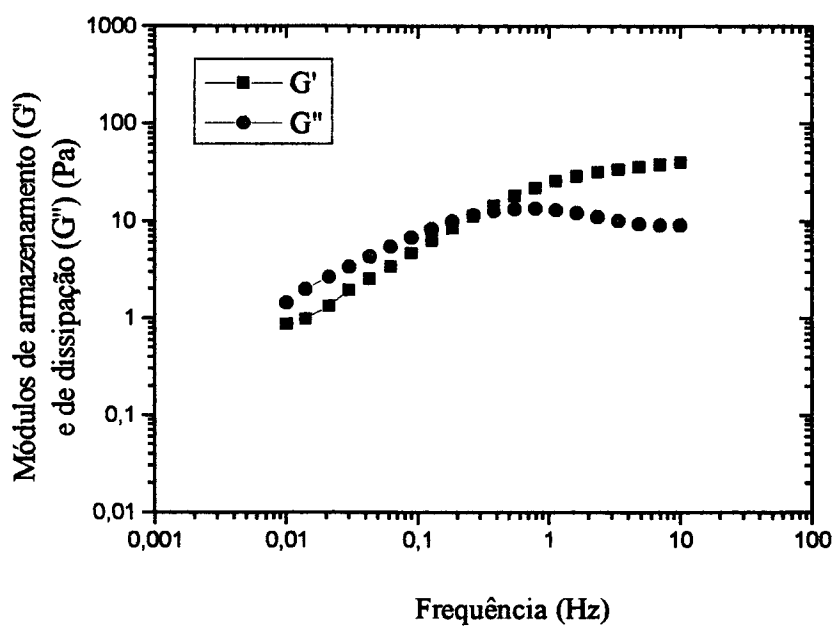


Figura 4.16 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de glicerol congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.

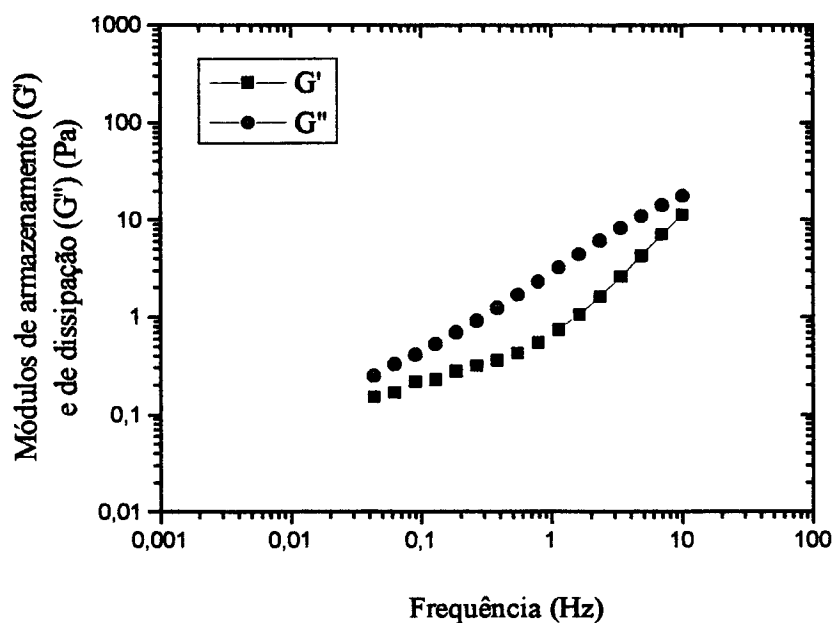


Figura 4.17 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de glicerol sem congelar.

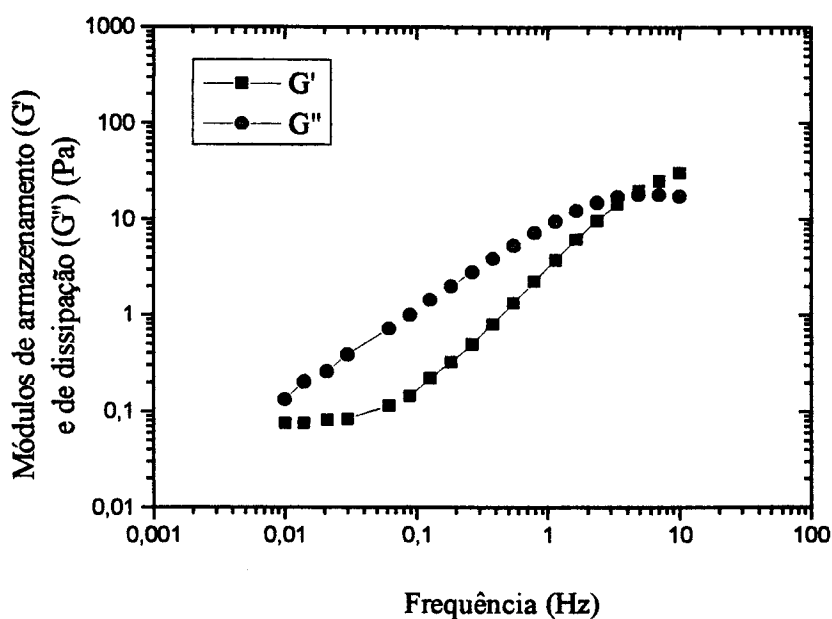


Figura 4.18 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de glicerol congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.

A sacarose e o glicerol são compostos que vêm sendo empregados já há muito tempo como crio-protetores, mostrando-se eficiente em evitar a desnaturação de diversos tipos de proteínas durante o congelamento (NEMA & AVIS, 1993; YONN & LEE, 1990; SYCH et alii, 1990; WATANABE et alii, 1988; FRANKS, 1977). Entretanto, não existem trabalhos conclusivos a respeito do mecanismo de ação dessas substâncias. CARPENTER & CROWE (1988) defendem a hipótese apresentada por ARAKAWA & TIMASHEFF (1982a e b), segundo a qual a capacidade de tais solutos de estabilizar a estrutura nativa das proteínas deve-se à sua exclusão preferencial da superfície das mesmas na solução não-congelada. A exclusão do soluto da superfície da proteína é termodinamicamente desfavorável, pois resulta na redução da entropia do sistema. Nesse ambiente, o desdobramento da proteína causaria uma exposição adicional de área superficial, aumentando a exclusão do soluto e tornando a situação ainda mais desfavorável. Assim, a proteína permanece em sua conformação original. Por outro lado, se os solutos têm tendência de ligação preferencial à proteína (como a uréia e o hidrocloreto de guanidino), sua desnaturação, como forma de expor um maior

número de sítios de ligação, será termodinamicamente favorecida. Essas duas possibilidades estão esquematizadas na Figura 4.19.

Esse mecanismo de ação é compatível com os resultados observados neste trabalho, uma vez que não houve gelificação após o congelamento da gema na presença de quantidades suficientes de sacarose e glicerol, indicando que o arranjo original das macromoléculas foi preservado (Figuras 4.14 e 4.17).

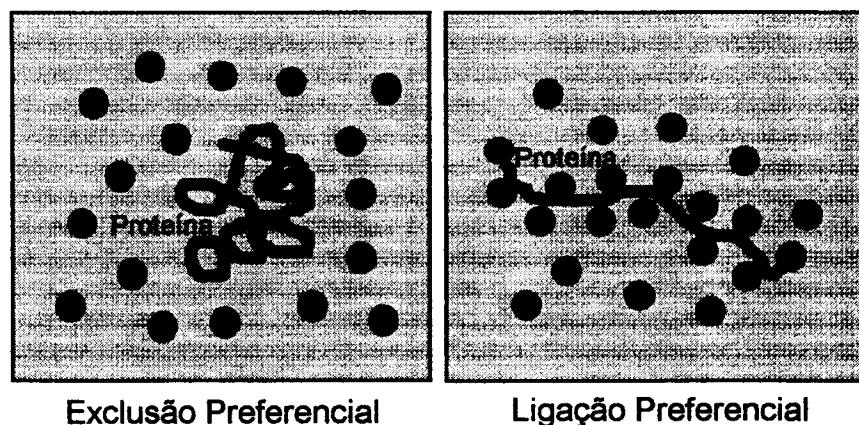


Figura 4.19 - Representação esquemática do mecanismo de ação de crio-protetores por exclusão ou ligação preferencial à superfície das proteínas (CROWE et alii, 1990).

Nas Figuras 4.20 a 4.22, apresenta-se a evolução dos módulos de armazenamento e dissipação para gema tratada com 2 e 10% de KCl antes e depois do congelamento a -24 °C por 36 horas.

Antes do congelamento, o efeito da adição de 2% de KCl é muito semelhante ao do cloreto de sódio. Isto é, o comportamento da gema é similar ao de uma solução concentrada de macromoléculas, com o cruzamento das curvas de G' e G'' ocorrendo por volta de $f = 1,4$ Hz. Quando a concentração do sal é aumentada para 10% observa-se o aparecimento de uma estrutura mais ordenada, com tempo de relaxação mais elevado, uma vez que o cruzamento das curvas acontece por volta de 0,38 Hz (Tabela 4.1).

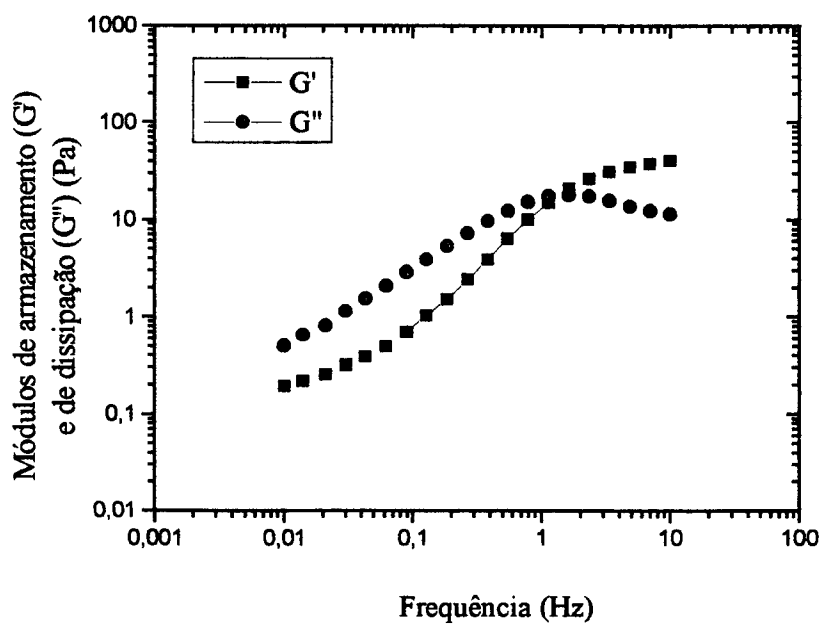


Figura 4.20 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de KCl sem congelar.

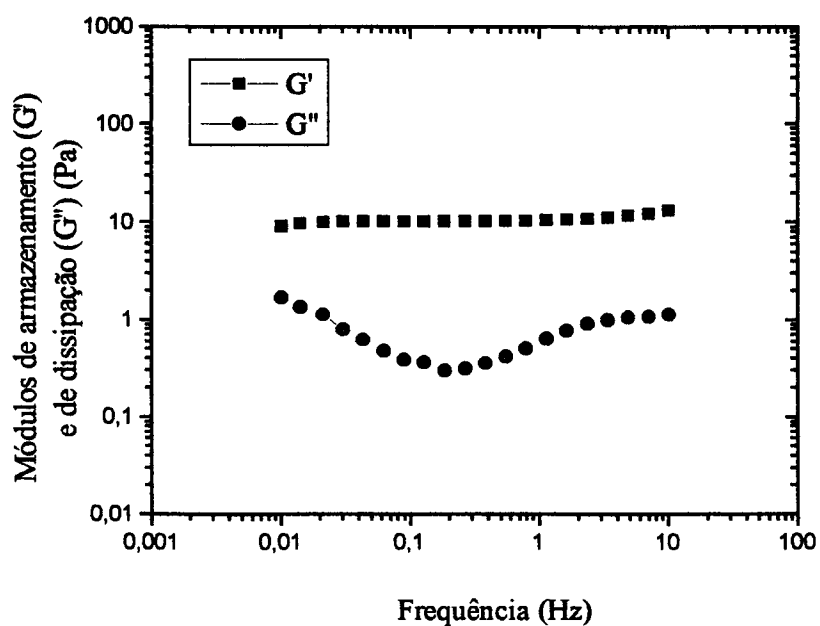


Figura 4.21 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de KCl congelada a -24 °C por 36 horas.

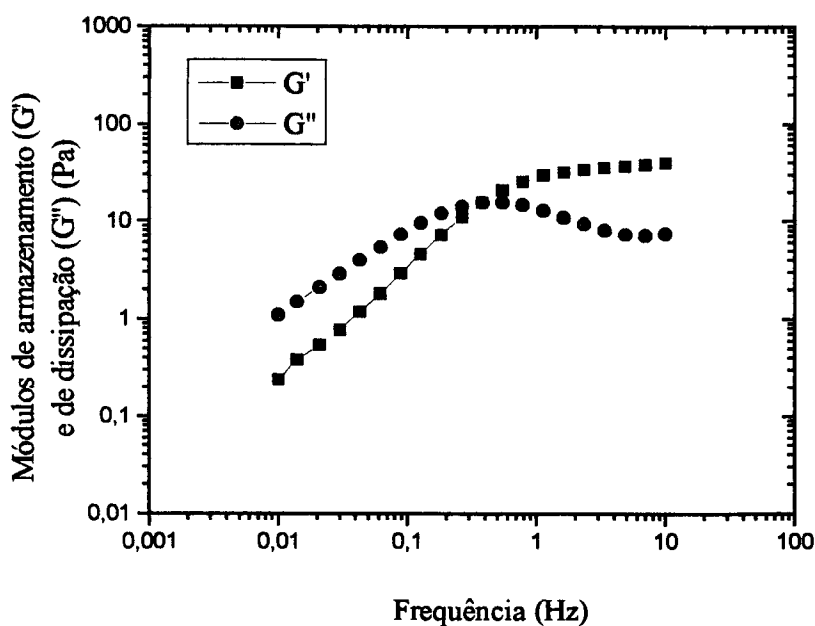


Figura 4.22 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de KCl sem congelar.

Após o congelamento, no entanto, a gema com 2% de KCl revela-se completamente gelificada. O módulo de armazenamento domina toda a faixa de frequência e é praticamente constante. Esse comportamento revela a existência de interações fortes entre as moléculas. Além disso, a estrutura formada pode ser considerada homogênea, já que não existem regiões de inclinação diferente na curva de G' , como observado nas Figuras 4.4 e 4.5.

Para a gema congelada contendo 10% de KCl não foi possível a realização de medidas reológicas confiáveis, devido a limitações do reômetro. O aspecto visual da amostra fazia crer no desenvolvimento de uma estrutura elástica. Entretanto, houve dificuldade na introdução da amostra no tubo capilar e a magnitude dos módulos de armazenamento e dissipação ultrapassou o limite de sensibilidade do instrumento.

Em princípio, o efeito do cloreto de potássio sobre as propriedades reológicas da gema poderia ser justificado de forma semelhante ao do NaCl, ao menos antes do congelamento, uma vez que o comportamento observado nas Figuras 4.20 e 4.21 é muito parecido àquele correspondente a concentrações iguais de cloreto de

sódio. Porém, após o congelamento o KCl contribui para o incremento do caráter elástico da gema, o que pode indicar uma participação efetiva do íon K^+ nas interações de caráter permanente.

BARBUT & MITTAL (1988) observaram que a adição de KCl e NaCl tinham efeito similar sobre o comportamento reológico de emulsões de carne de frango. Em um trabalho posterior, GORDON & BARBUT (1990) concluíram, através de micrografias de emulsões de carne preparadas com diferentes sais, que a proteína envolvida na estabilização de géis formados com NaCl é diferente daquela envolvida em redes contendo KCl.

Em relação ao caso específico da gema de ovo, pode-se citar o trabalho de SATO & AOKI (1975), onde os autores verificaram uma diferença bastante significativa na turbidez de amostras de lipoproteína de baixa densidade tratadas com diferentes sais e congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O aumento da turbidez após o congelamento para a amostra contendo KCl foi muito maior que o verificado na amostra contendo NaCl, o que foi atribuído ao fato de que a temperatura de congelamento ficou abaixo do ponto eutético do cloreto de potássio ($-11,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) mas acima do do cloreto de sódio ($-21,3\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Considerando que, no presente trabalho, a temperatura de congelamento ($-24\text{ }^{\circ}\text{C}$) também foi inferior à temperatura eutética do NaCl, fica demonstrado que esta não é uma explicação satisfatória para as diferenças entre o efeito desses sais, embora o fato de serem ambos monovalentes conduza à hipótese de comportamento similar.

As propriedades reológicas da gema tratada com MgCl_2 mostraram-se completamente distintas das amostras contendo outros sais. A Figura 4.23 demonstra que o módulo de dissipação da gema de ovo com 2% de MgCl_2 é maior que o de armazenamento até a frequência de 2,9 Hz, onde se dá o cruzamento das curvas (Tabela 4.1).

Quando o teor de MgCl_2 é aumentado para 10% (Figura 4.25) esse cruzamento só acontece em $f = 7,6\text{ Hz}$, um comportamento encontrado apenas na gema aditivada com sacarose ou glicerol.

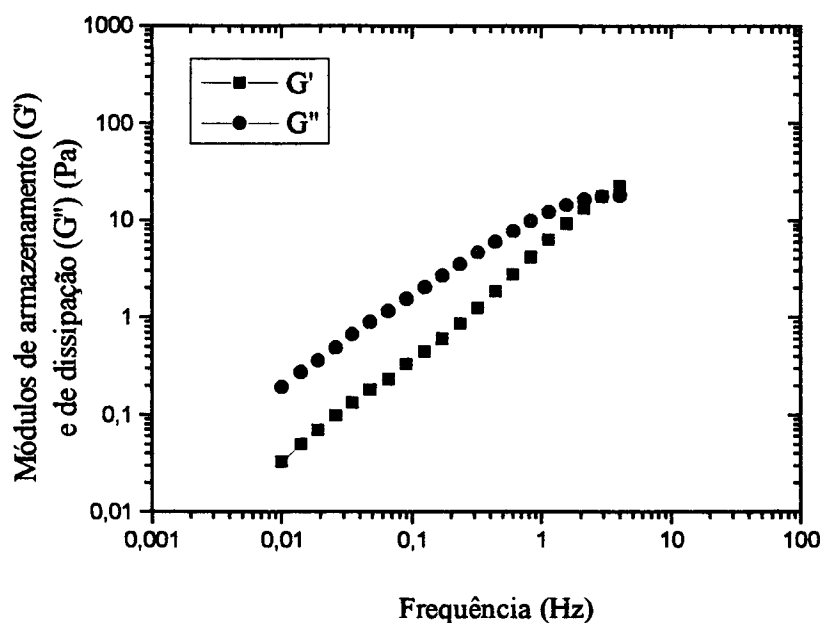


Figura 4.23 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de $MgCl_2$ sem congelar.

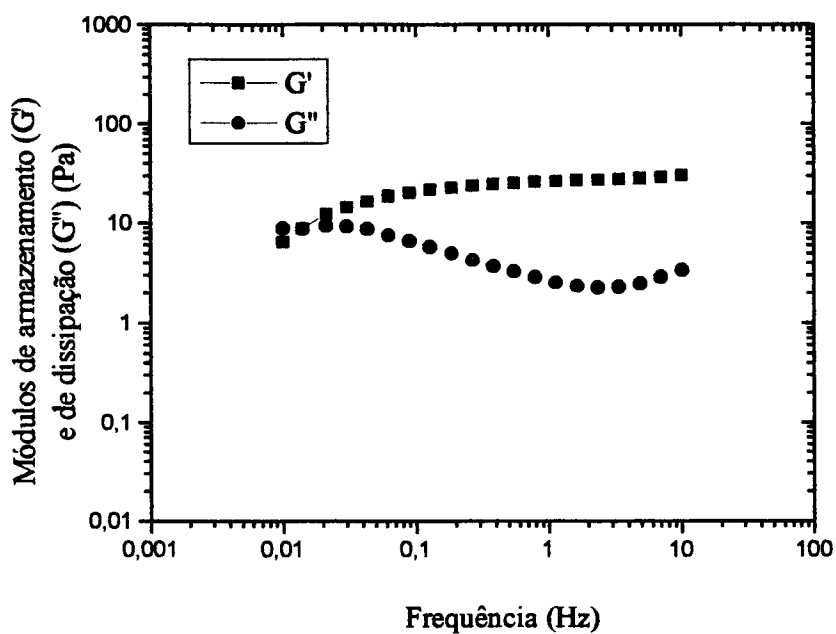


Figura 4.24 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de $MgCl_2$ congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.

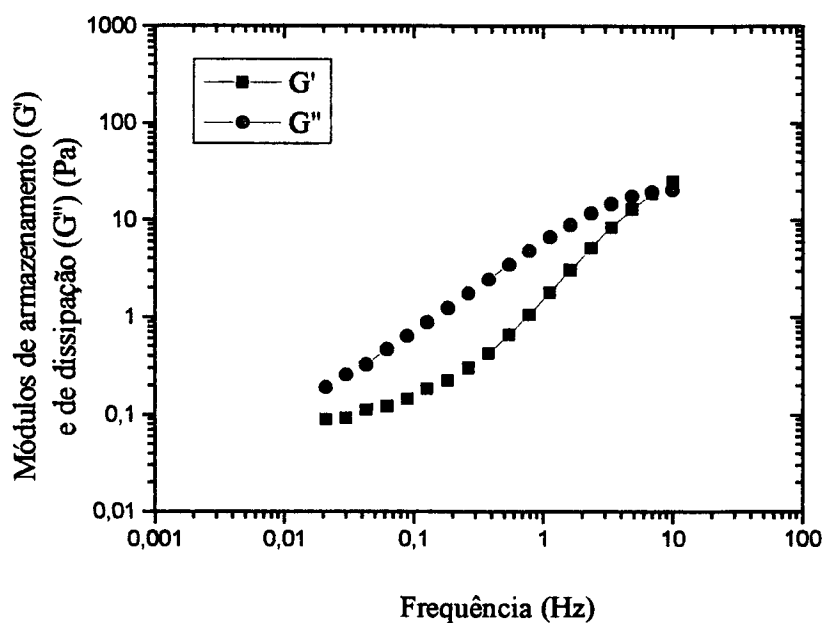


Figura 4.25 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de $MgCl_2$ sem congelar.

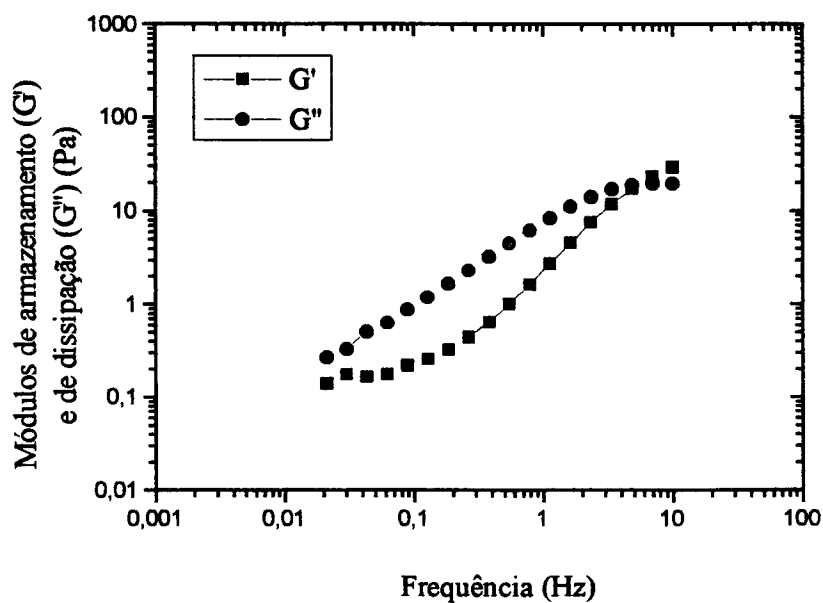


Figura 4.26 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de $MgCl_2$ congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.

Mesmo assim, a exemplo dos outros aditivos estudados, o MgCl_2 não é capaz de evitar completamente o efeito de agregação causado pelo congelamento. A gema de ovo tratada com 2% de MgCl_2 fornece uma resposta muito semelhante à amostra contendo NaCl quando congelada, embora a magnitude de G'' seja menor neste último caso (Figura 4.8). O aumento da concentração de MgCl_2 para 10% impede completamente a gelificação após o congelamento.

Esses resultados podem ser comparados aos apresentados por BARBUT & MITTAL (1988), no estudo reológico de emulsões de carne de frango. Em relação ao efeito do cloreto de sódio e do cloreto de potássio, a adição de cloreto de magnésio ao sistema é responsável pela redução do “caráter Binghamiano” da emulsão e da tensão inicial necessária para o escoamento. Além disso durante o aquecimento das emulsões, aquela contendo cloreto de magnésio “quebrou”, isto é, perdeu a estabilidade.

GORDON & BARBUT (1990) observaram que o MgCl_2 produziu emulsões cárneas cuja matriz proteica possuía pouca integridade, apresentando grandes poros e poucas interconexões, além de glóbulos de gordura não adequadamente estabilizados por um filme de proteínas. No mesmo trabalho foram realizados ensaios com CaCl_2 , cujos resultados revelaram a formação de uma matriz proteica mais densa e coesiva, bem como a existência de um filme estabilizante ao redor dos glóbulos de gordura.

Nas Figuras 4.27 a 4.29, observa-se que o cloreto de cálcio também age de maneira diferente do cloreto de magnésio quando adicionado à gema de ovo. Esse sal parece estimular a gelificação antes mesmo do congelamento.

O gráfico correspondente à gema com 2% de CaCl_2 sem congelar apresenta curvas de G' e G'' menos inclinadas em relação à frequência, além de que o módulo de armazenamento passa a predominar já a partir de 0,32 Hz. Após o congelamento, a amostra apresentou-se completamente gelificada, com G' superior a G'' e praticamente independente da frequência em toda a faixa analisada. Esse comportamento indica o desenvolvimento de ligações intermoleculares de caráter permanente, já incipientes após a adição do sal e consolidadas durante o congelamento.

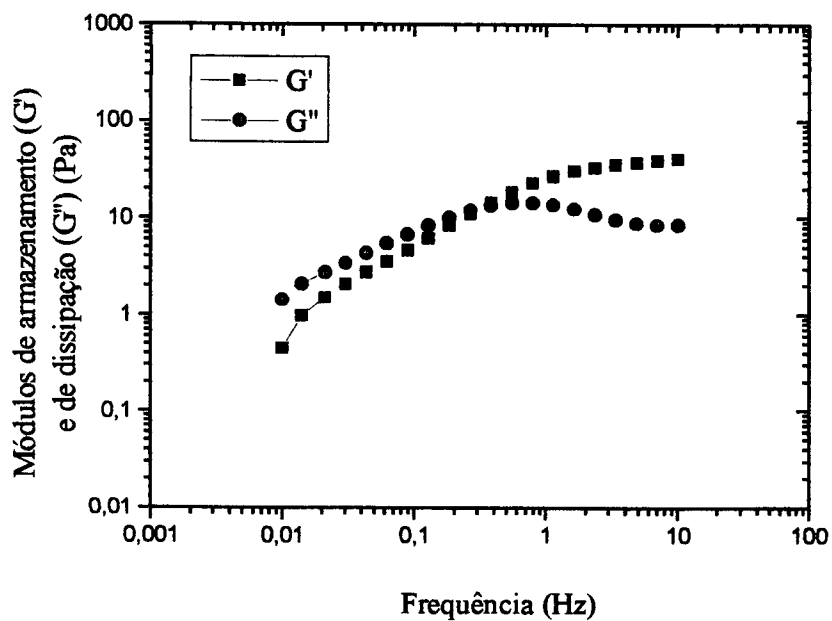


Figura 4.27 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de CaCl_2 sem congelar.

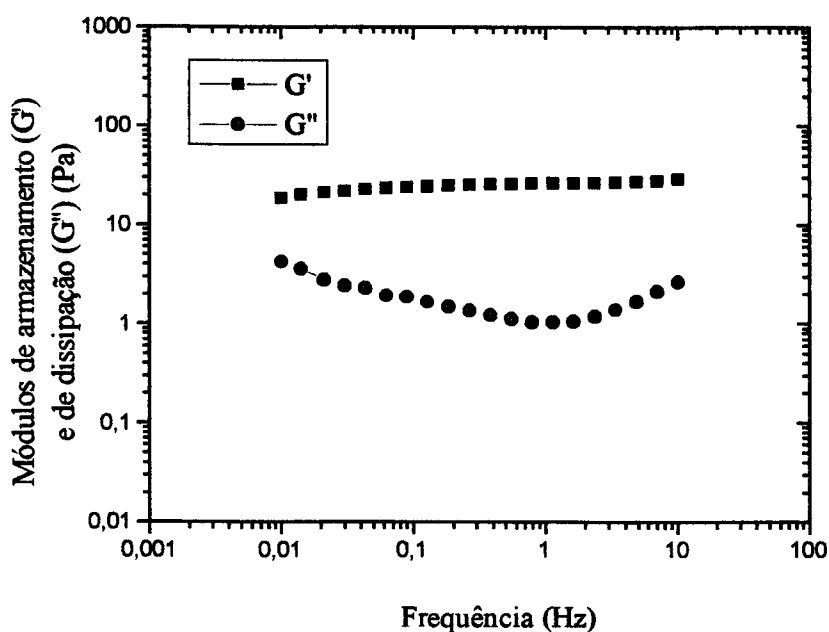


Figura 4.28 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 2% de CaCl_2 congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas.

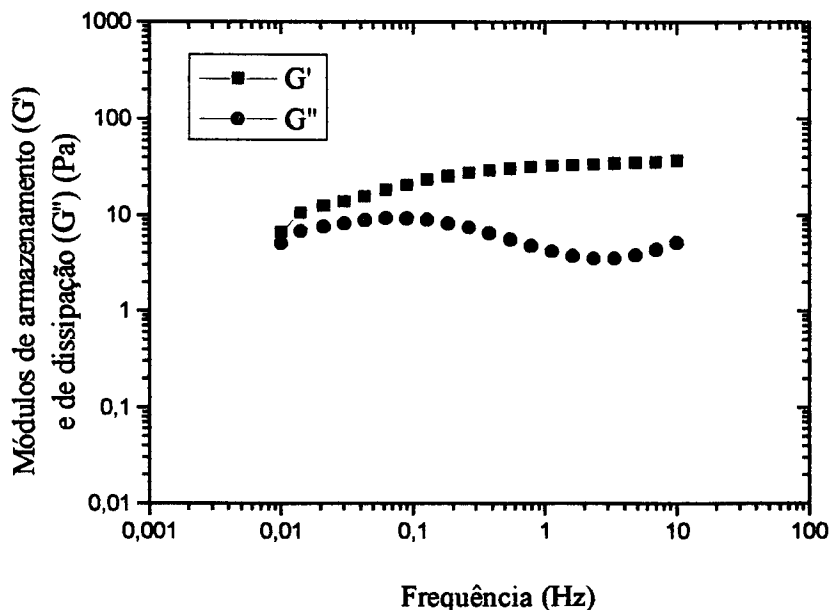


Figura 4.29 - Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da frequência de gema com 10% de CaCl_2 sem congelar.

Os resultados obtidos com o aumento da concentração de CaCl_2 para 10% reforçam essa conclusão, embora não tenha sido possível medir as propriedades reológicas da gema com 10% de CaCl_2 após o congelamento devido à gelificação excessiva. Sem o congelamento, a amostra já apresenta características elásticas semelhantes às das amostras congeladas com 2% de NaCl e MgCl_2 , como pode ser observado comparando as Figuras 4.8, 4.24 e 4.29.

Resultados compatíveis foram obtidos por SATO & AOKI (1975), que verificaram um aumento acentuado na turbidez de soluções de lipoproteína de baixa densidade às quais foi adicionado cloreto de cálcio. CAUSERET et alii (1991) consideram que o íon Ca^{++} poderia ser responsável pelo desenvolvimento de pontes iônicas entre os grupos fosfato presentes na fosvitina, lipovitelina e lipoproteína de baixa densidade. Os átomos de fósforo da lipoproteína de baixa densidade estão localizados nos fosfolipídios, na superfície das micelas. Isso poderia favorecer a interconexão das mesmas, porém, sem implicar em sua completa desestabilização com

conseqüente liberação dos lipídios localizados no seu interior, como parece ocorrer quando o MgCl_2 é adicionado à gema.

GRIZZUTI & PERLMANN (1973) confirmaram, através de experimentos de diálise, dispersão óptica rotatória e dicroísmo circular, que a fosvitina apresenta diferente capacidade de ligação em relação ao cálcio e ao magnésio, havendo preferência pelo primeiro. Além disso, verificaram que a presença de cada um desses cátions tem efeitos distintos na conformação molecular dessa proteína.

4.1.2. Efeitos da Velocidade de Congelamento e Temperatura de Estocagem

Os efeitos da velocidade de congelamento e da temperatura de estocagem sobre o grau de gelificação da gema de ovo foram estudados com o auxílio de medidas reológicas dinâmicas, pelo acompanhamento da evolução dos módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função do tempo de estocagem. Através dos resultados consegue-se distinguir, dentre os tratamentos, aqueles que causam ou permitem a gelificação e aqueles que provocam apenas o aumento da viscosidade.

Como gelificação, entende-se o estado em que o módulo de armazenamento é superior ao de dissipação, enquanto que o aumento de viscosidade é caracterizado pelo aumento de ambos os módulos, mas com predominância do módulo de dissipação.

O emprego de altas velocidades de congelamento é um fator fundamental na manutenção da qualidade da maioria dos produtos congelados e, quando se trata da gema de ovo, não é diferente. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o controle da velocidade de congelamento não é suficiente para impedir a gelificação da gema, podendo apenas retardá-la. Para evitar a gelificação é essencial combinar altas taxas de congelamento com temperaturas de estocagem tão baixas quanto possível.

A Figura 4.30 apresenta os módulos de armazenamento e dissipação da gema pura congelada em diferentes velocidades e depois armazenada em diferentes temperaturas por 23 horas. Os tempos necessários para que as respectivas amostras atingissem a temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ em seu centro térmico, calculados segundo o procedimento descrito no Apêndice A, são indicados na Tabela 4.2. Nestes ensaios, as amostras, em temperatura ambiente, foram diretamente colocadas no banho onde seriam armazenadas e, portanto, a temperatura do meio de congelamento era igual à temperatura de estocagem. A Figura 4.31 refere-se a amostras submetidas a uma “crio-estruturação”, através de imersão em um banho de gelo seco (CO_2 sólido) e etanol, cuja temperatura é de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos, antes de sua transferência para o banho de temperatura mais elevada, onde ficaram armazenadas.

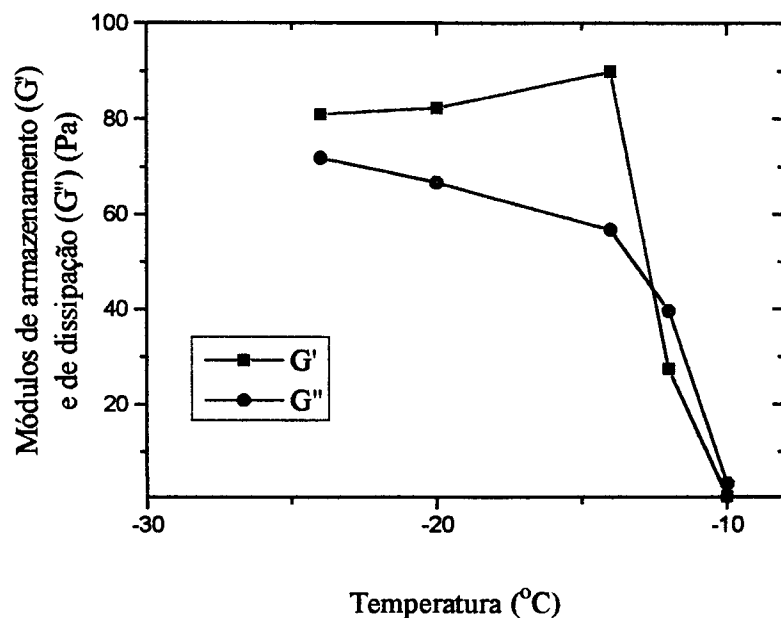


Figura 4.30 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') em função da temperatura de estocagem da gema pura após 23 horas, com tempos de congelamento dados pela Tabela 4.2.

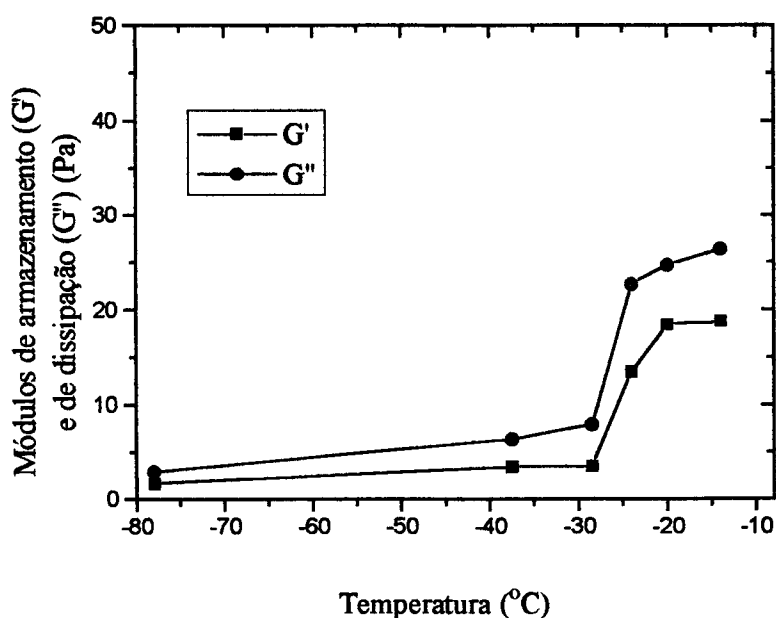


Figura 4.31 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') da gema pura, submetida à crio-estruturação a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, em função da temperatura de estocagem após 23 horas.

Tabela 4.2 - Tempos de congelamento em função da temperatura do meio de refrigeração, calculados de acordo com o Apêndice A.

TEMPERATURA DO MEIO DE REFRIGERAÇÃO (°C)	TEMPO PARA O CENTRO TÉRMICO DA AMOSTRA ATINGIR -10 °C (min)
-10	50
-12	42
-14	36
-20	25
-24	21
-78	7,5

Considerando as mesmas temperaturas de armazenamento, observa-se uma diferença significativa entre o desenvolvimento das propriedades reológicas da gema congelada sob diferentes processos. A crio-estruturação mantém os módulos G' e G'' em um patamar inferior e, além disso, o módulo de armazenamento é sempre menor que o módulo de dissipação, indicando que, no tempo considerado não, houve gelificação em nenhuma das temperaturas de estocagem testadas.

Por outro lado, quando o congelamento é efetuado diretamente na temperatura de estocagem e esta é inferior a -12 °C , ocorre a rápida elevação dos módulos, resultando em um produto de estrutura elástica, com G' maior que G'' .

Entretanto, através de ensaios de congelamento por períodos maiores, pôde-se comprovar que as alterações nas propriedades reológicas da gema de ovo continuam ao longo do tempo, de forma que, se a temperatura de estocagem não for cuidadosamente selecionada, as vantagens obtidas com a crio-estruturação serão facilmente anuladas. Isso pode ser comprovado nas Figuras 4.32 a 4.37, que apresentam os resultados de testes de armazenamento prolongado em diferentes temperaturas após congelamento a -78 °C . Também são incluídos, nas Figuras 4.32 a 4.34, os resultados dos ensaios em que as amostras foram congeladas e armazenadas na mesma temperatura (linhas sólidas).

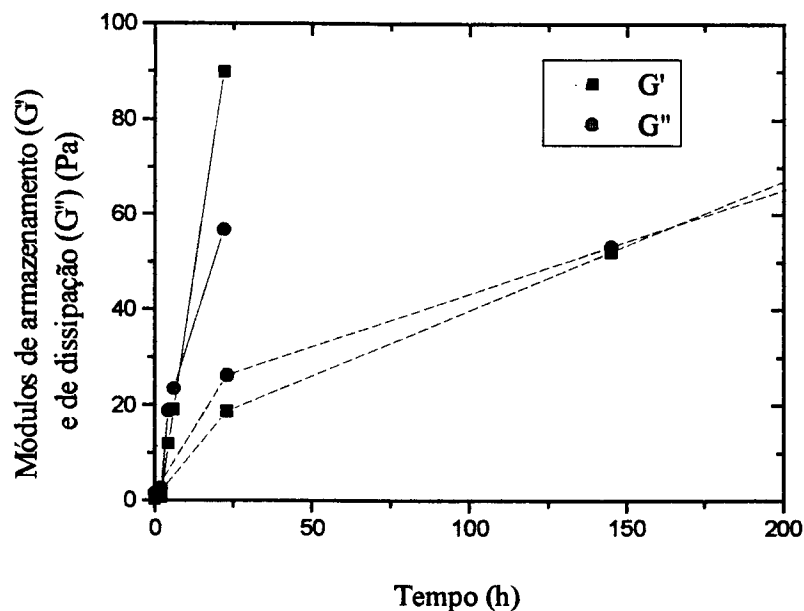


Figura 4.32 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura em função do tempo de estocagem a $-14,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. As linhas tracejadas correspondem a amostras submetidas à crio-estruturação antes da estocagem.

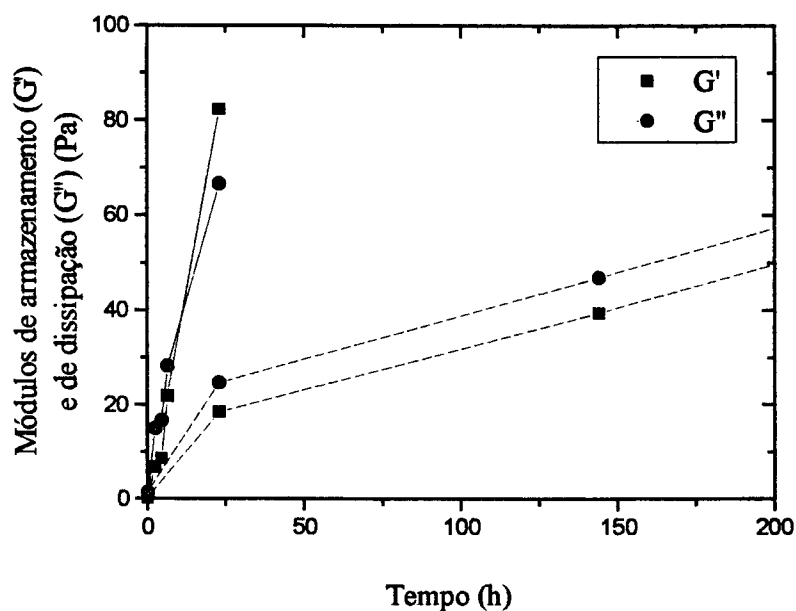


Figura 4.33 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura em função do tempo de estocagem a $-20,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. As linhas tracejadas correspondem a amostras submetidas à crio-estruturação antes da estocagem.

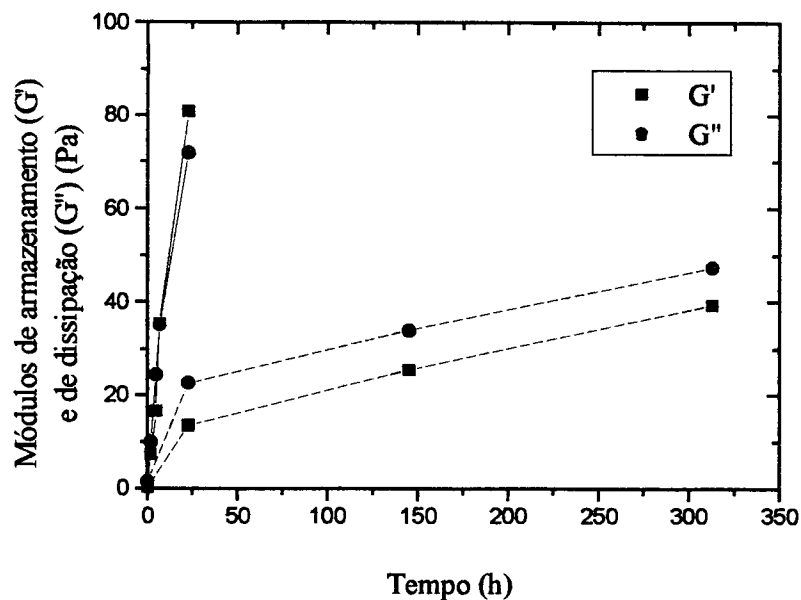


Figura 4.34 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura em função do tempo de estocagem a $-24,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. As linhas tracejadas correspondem a amostras submetidas à crio-estruturação antes da estocagem.

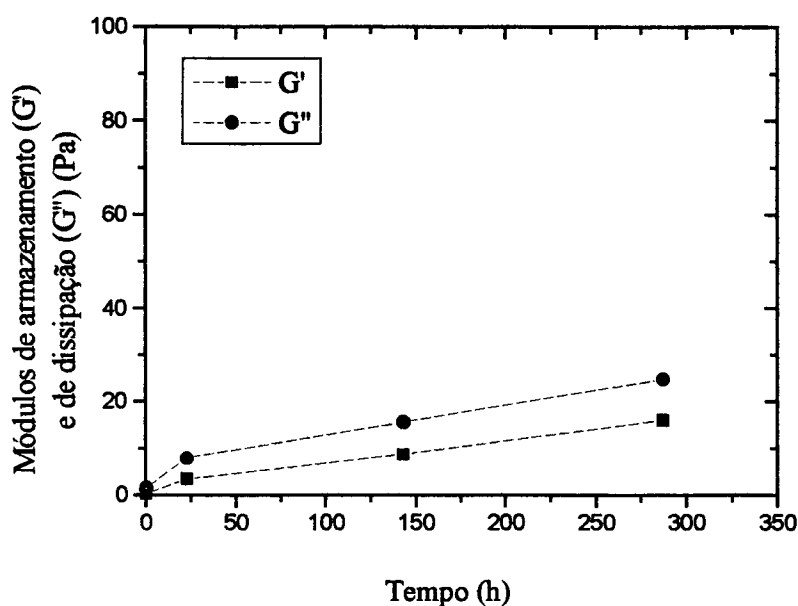


Figura 4.35 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura submetida à crio-estruturação, em função do tempo de estocagem a $-28,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

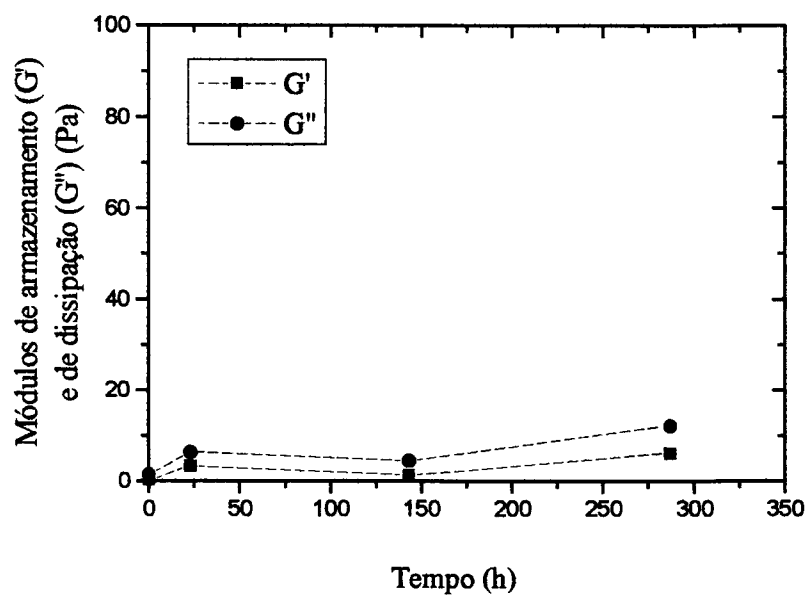


Figura 4.36 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura submetida à crio-estruturação, em função do tempo de estocagem a $-37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

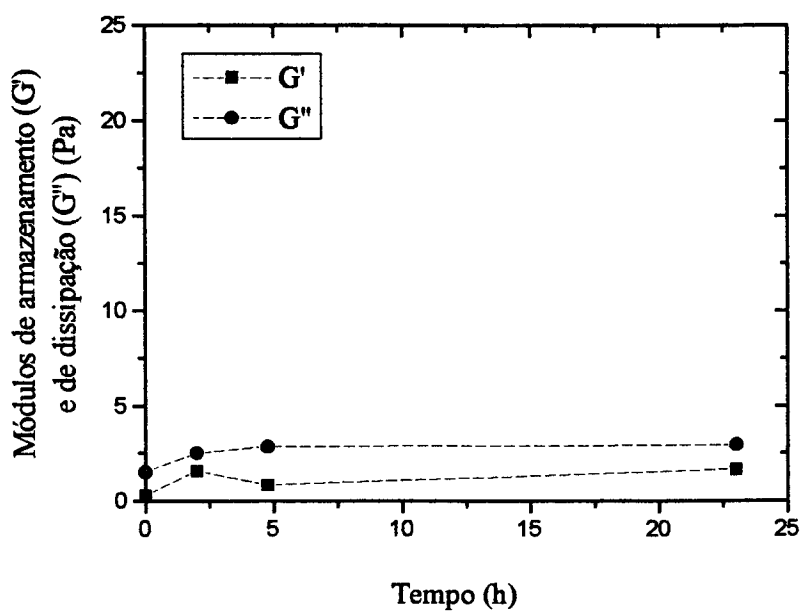


Figura 4.37 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura submetida à crio-estruturação, em função do tempo de estocagem a $-78,0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Para temperaturas de estocagem superiores a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, observa-se que, mesmo com a crio-estruturação prévia, também existe a tendência à gelificação. Na Figura 4.32, referente à estocagem a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$, verifica-se que os módulos G' e G'' praticamente atingiram o mesmo valor após 145 h (aproximadamente 6 dias) de armazenamento a baixa temperatura. Na realidade, este ensaio foi prolongado por mais uma semana e foi possível comprovar visualmente que a gelificação efetivamente ocorreu. No entanto, os parâmetros reológicos da amostra correspondente ao tempo de 312 horas de estocagem (13 dias) não puderam ser determinados por estarem fora da faixa de sensibilidade do reômetro (ver discussão na seção 3.4). O mesmo aconteceu com a amostra armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4.33) pelo mesmo período.

No ensaio de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4.34), o aumento de G' e G'' foi mais lento, permitindo que todas as amostras preparadas fossem analisadas. Embora não tenha ocorrido a gelificação, verificou-se uma progressiva elevação dos módulos de armazenamento e dissipação, fazendo supor que, se o ensaio fosse continuado, ela provavelmente iria acontecer.

Em relação às amostras cuja velocidade de congelamento foi lenta (linhas sólidas), observa-se que a cinética de gelificação é muito diferente. Os módulos crescem a uma taxa muito elevada e, em intervalos de tempo inferiores a 24 horas, atingem valores maiores que os obtidos após aproximadamente duas semanas de estocagem das amostras submetidas à crio-estruturação.

Retornando à análise da Figura 4.30, verifica-se que, para congelamento e estocagem a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, não ocorre a gelificação no tempo considerado. Os módulos G' e G'' passam de 0,29 Pa e 1,55 Pa, respectivamente, antes do congelamento, para 1,45 Pa e 5,31 Pa, após o descongelamento, caracterizando apenas um pequeno aumento na viscosidade do produto. O armazenamento a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, por outro lado, tem efeitos mais acentuados, provocando uma forte elevação de tais propriedades, embora no intervalo de tempo considerado não tenha ocorrido o cruzamento das curvas.

Na faixa de temperaturas de -14 a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, para o período considerado e para cada velocidade de congelamento, não existe diferença considerável entre os valores

obtidos para os módulos de armazenamento e dissipação. Entretanto, ocorre uma redução brusca em G' e G'' entre as temperaturas de -24 e $-28,5$ °C para amostras crio-estruturadas (Figura 4.31). A partir daí, manifesta-se uma tendência de queda em tais parâmetros.

Nas Figuras 4.35 a 4.37, constata-se que a estocagem em temperaturas inferiores a -24 °C realmente favorece a manutenção dos módulos em níveis significativamente inferiores, mesmo por períodos de estocagem mais longos. O ensaio a $-37,5$ °C durou 12 dias e os valores de G' e G'' foram, respectivamente iguais a 6,25 Pa e 12,18 Pa, enquanto amostras não submetidas à crio-estruturação, depois de apenas 23 horas de estocagem resultaram em $G' = 80,87$ Pa e $G'' = 71,87$ Pa.

Um comportamento semelhante em relação à temperatura de congelamento foi observado por SOLIMAN & VAN DEN BERG (1971), considerando o aumento de turbidez de soluções de lipoproteína de baixa densidade isolada da gema de ovo. A turbidez aumentou à medida que a temperatura foi reduzida de -4 para -20 °C, mas esse aumento diminuiu quando o armazenamento foi efetuado em temperaturas na faixa de -30 a -35 °C.

Os resultados apresentados até este ponto demonstram que o aumento da velocidade de congelamento é importante para impedir a gelificação, mas também é indispensável garantir que a estocagem seja feita em temperaturas inferiores a -30 °C.

Uma possível explicação para esse comportamento baseia-se na teoria da crioestabilização, proposta por LEVINE & SLADE (1988, 1989) e descrita brevemente na seção 2.3 deste trabalho. Assumindo que a temperatura de transição vítrea da matriz maximamente concentrada (T_g') estivesse no intervalo de -24 a -28 °C, os resultados expostos anteriormente poderiam ser interpretados satisfatoriamente segundo essa teoria.

Altas velocidades de congelamento, conduzem o material quase instantaneamente a uma temperatura inferior a T_g' . Nessas condições, a matriz amorfa que circunda os cristais de gelo é mantida completamente solidificada, com uma viscosidade da ordem de 10^{12} Pa.s, em um estado de baixa mobilidade das moléculas,

onde as transformações físico-químicas, que podem resultar na redução da qualidade e estabilidade do produto, são muito lentas em relação à escala de tempo considerada.

Por outro lado, se o material é mantido a uma temperatura superior a T_g' , seu estado físico corresponderá ao de um fluido “pastoso”, permitindo a difusão translacional das moléculas de solutos e reduzindo sua estabilidade. Além disso, os processos de deterioração controlados pela difusão em um material alimentício estocado em tais condições, ocorrem a taxas determinadas pela diferença $\Delta T = T - T_g'$. Essas taxas aumentam exponencialmente com o aumento de ΔT , segundo a cinética WLF (Williams-Landel-Ferry), ao invés de aumentarem segundo uma cinética do tipo Arrhenius.

A equação WLF pode ser escrita como:

$$\log \frac{(\eta/\rho T)}{(\eta_g/\rho_g T_g')} = - \frac{C_1(T - T_g')}{C_2 + (T - T_g')} \quad (4.2)$$

Na equação 4.2, η é a viscosidade ou outro processo de relaxação limitado pela difusão, ρ é a densidade e o índice g refere-se a estas propriedades na temperatura de transição vítrea. C_1 e C_2 são constantes que descrevem a dependência do processo de relaxação em temperaturas superiores à temperatura de referência, T_g' . C_1 é proporcional ao inverso do volume livre do sistema em T_g' , enquanto C_2 é proporcional à razão entre o volume livre em T_g' e a diferença entre os volumes livres no estado de fluido “pastoso” e sólido amorfo, como função da temperatura acima de T_g' . Para polímeros sintéticos bem comportados, cuja relação T_m/T_g' (onde T_m é a temperatura de fusão) fica em torno de 1,5, C_1 e C_2 assumem os “valores universais” de 17,44 e 51,6, respectivamente (SLADE & LEVINE, 1991; FERRY, 1980).

A equação WLF é baseada nas hipóteses de que o volume livre de um sistema polimérico aumenta linearmente com o aumento da temperatura acima de T_g' e que a viscosidade a nível molecular decresce rapidamente com o aumento do volume

livre. Assim, quanto mais a temperatura é aumentada em relação a T_g' , maior é a velocidade com que o sistema pode sofrer processos de relaxação.

Os resultados dos ensaios de calorimetria diferencial de varredura, apresentados no item 4.2 deste trabalho, embora não tenham sido conclusivos, oferecem indicações de que, para a gema de ovo, T_g' pode ser tomada como $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou 249 K (Figura 4.66). Considerando T_m como sendo o ponto de início de congelamento (T_{ic}) igual a $-0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($272,3\text{ K}$), determinado experimentalmente neste trabalho, a relação T_m/T_g' é de 1,09. SLADE & LEVINE (1991) recomendam que polímeros cuja razão T_m/T_g seja inferior a 1,5, geralmente caracterizados por estruturas altamente assimétricas, sejam descritos pela equação 4.2 com $C_1 = 12,3$ e $C_2 = 23,3$.

Empregando os resultados de variação do módulo de armazenamento (G') em função do tempo de estocagem em diversas temperaturas de amostras submetidas à crio-estruturação a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figuras 4.32 a 4.36), foi determinado o parâmetro $\alpha = dG'/dt$, que pode ser interpretado como uma “velocidade de gelificação”. Os valores de α em função da temperatura de estocagem encontram-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Valores de $\alpha = dG'/dt$ em função da temperatura de estocagem (T) de amostras submetidas à crio-estruturação. A relação $\log (\eta/\eta_g)$ é calculada pela Equação 4.2, com $C_1 = 12,3$ e $C_2 = 23,3$.

α (Pa/s)	T ($^{\circ}\text{C}$)	$(T-T_g)$ (K)	$\log (\alpha/\alpha_g)$	$\log (\eta/\eta_g)$
$7,53 \times 10^{-5}$	-14,0	10	0,49	-3,69
$4,92 \times 10^{-5}$	-20,0	4	0,30	-1,80
$2,50 \times 10^{-5}$	-24,0	0	0	0
$1,34 \times 10^{-5}$	-28,5	-	-	-
$3,21 \times 10^{-6}$	-37,5	-	-	-

Com o objetivo de comparar a dependência da cinética de gelificação, representada por α , com a variação da viscosidade da solução congelada, dada pela Equação 4.2, adotou-se como referência o valor de $\alpha_g = 2,50 \times 10^{-5}$ Pa/s, correspondente à temperatura $T_g' = -24$ °C, e determinou-se a relação $\log (\alpha/\alpha_g)$, também incluída na Tabela 4.3 e representada na Figura 4.38 em função de $(T-T_g')$, juntamente com $\log (\eta/\eta_g)$ dada pela equação WLF. É preciso lembrar que a Equação 4.2 só é válida para temperaturas entre T_m e T_g' . Fora dessa faixa, os processos de relaxação obedecem a cinética de Arrhenius (SLADE & LEVINE, 1991).

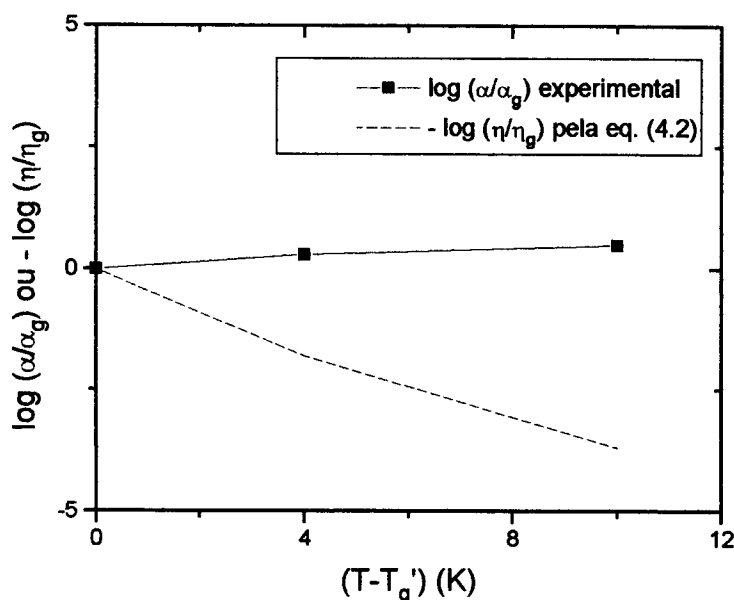


Figura 4.38 - Variação da velocidade de gelificação determinada experimentalmente e da viscosidade da solução congelada dada pela equação WLF em função do afastamento da temperatura em relação a T_g' .

Verifica-se que a velocidade de gelificação (α) aumenta à medida que a viscosidade da solução congelada diminui, o que é coerente com a teoria da crioestabilização, uma vez que, à medida que a temperatura aumenta em relação a T_g' , maior é o volume livre do sistema e maior é a mobilidade das moléculas, favorecendo

interações entre as mesmas. Entretanto, a variação de $\log (\alpha/\alpha_g)$ em função de $(T-T_g')$ é praticamente linear, o que indica que a influência da temperatura é menos pronunciada do que seria esperado caso a cinética WLF fosse aplicada. Na realidade, a cinética de gelificação em função da temperatura de estocagem, em toda a faixa de temperaturas estudada, é mais adequadamente descrita por uma equação do tipo Arrhenius, conforme indica a Figura 4.39.

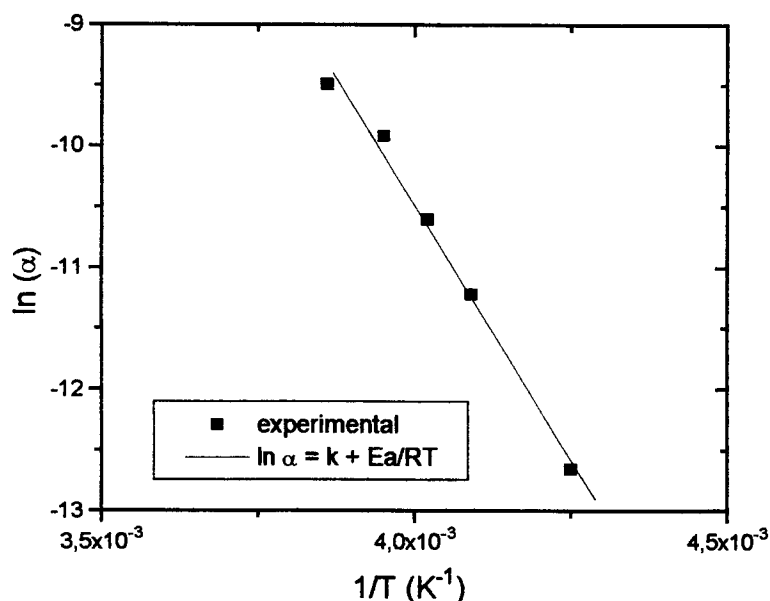


Figura 4.39 - Gráfico para determinação das constantes da equação do tipo Arrhenius.

Através de uma regressão linear de $\ln \alpha$ em função do inverso da temperatura de estocagem, é possível estabelecer o valor da energia de ativação para a variação do módulo de armazenamento (G') da gema, de acordo com a Equação 4.3:

$$\alpha = Ce^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (4.3)$$

O valor da energia de ativação, E_a , é de 16,6 kcal/mol e a constante C é igual a $8,39 \times 10^9$ Pa/s, sendo R a constante universal dos gases ideais, igual a $1,986 \times 10^{-3}$ kcal/mol K, e a temperatura, T , em K.

Segundo SIMATOS et alii (1989), a discordância entre a cinética WLF e a cinética de reações químicas controladas pela difusão em produtos congelados, pode estar relacionada com a complexidade do sistema. Esses autores consideram que, em temperaturas imediatamente superiores a T_g , os cristais de gelo começam a fundir, diluindo a matriz concentrada amorfa. A viscosidade dessa matriz, portanto, diminui com o aumento da temperatura em função de dois efeitos principais: a ação direta da temperatura sobre a viscosidade e a diluição resultante da fusão do gelo. Por outro lado, a taxa das reações químicas é influenciada pelo aumento da temperatura de uma forma mais complicada: ocorre um aumento na taxa de reação devido à redução da viscosidade, mas essa mesma taxa diminui devido à diluição dos reagentes.

Essa argumentação parece ser bastante satisfatória em relação ao processo aqui estudado, uma vez que isso explicaria a diminuição da velocidade, ou mesmo a não-ocorrência, de gelificação em temperaturas inferiores a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A importância da formação de gelo e conseqüente aumento da viscosidade e concentração na gelificação da gema é evidenciada pelo fato de que amostras mantidas a -10 e $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 23 horas, super-resfriadas, sem promover a formação de gelo, não apresentaram variações significativas em seus módulos de armazenamento e dissipação, como mostram as Figuras 4.40 e 4.41. Por outro lado, quando a formação de gelo foi induzida, esses parâmetros sofreram aumentos consideráveis, principalmente na estocagem a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, como se observa comparando as curvas das Figuras 4.42 e 4.43.

A gelificação é um fenômeno dependente do tempo de estocagem a baixa temperatura, o que pode ser observado nas Figuras 4.32 a 4.43. Um dos fatores que pode influenciar, pelo menos em parte, esse comportamento é o processo de maturação dos cristais de gelo. Durante o congelamento de uma solução, podem ser identificados três processos distintos: a nucleação, que consiste na formação de um número crítico de núcleos cristalinos, o crescimento dos cristais e a maturação, etapa na qual os cristais maiores crescem ainda mais, às custas da fusão dos de menor tamanho. A maturação é intensificada por flutuações na temperatura, mas também pode ocorrer

quando esta é constante (REID, 1983; MONZINI & MALTINI, 1984). O aumento no diâmetro médio dos cristais ao longo do tempo pode obrigar a aproximação das macromoléculas presentes na gema de ovo e favorecer o seu entrelaçamento, o que resulta na gelificação. O aumento da velocidade de congelamento e a redução da temperatura de armazenamento prejudica a maturação e favorece a presença de cristais pequenos e uniformemente distribuídos no produto, causando menores alterações estruturais.

Também deve-se considerar que, quando o grau de super-resfriamento do material a ser congelado é pequeno, pode haver a formação de cristais dendríticos, que crescem na forma de agulhas a partir da superfície e em direção oposta ao fluxo de calor. Esses cristais forçam a concentração da matéria sólida na região central, facilitando eventuais reações químicas ou interações de ordem física (BEVILACQUA & ZARITZKY, 1980; MENEGALLI & CALVELO, 1979).

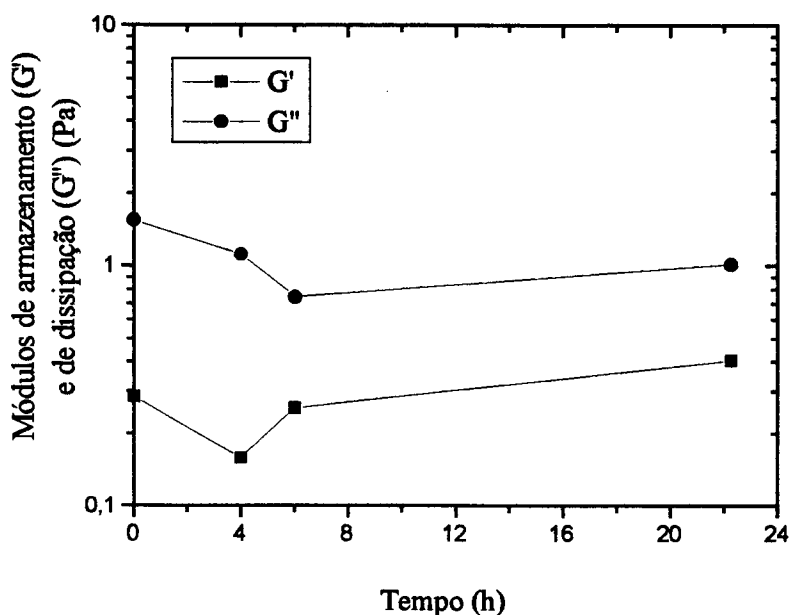


Figura 4.40 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura super-resfriada em função do tempo de estocagem a -10 °C .

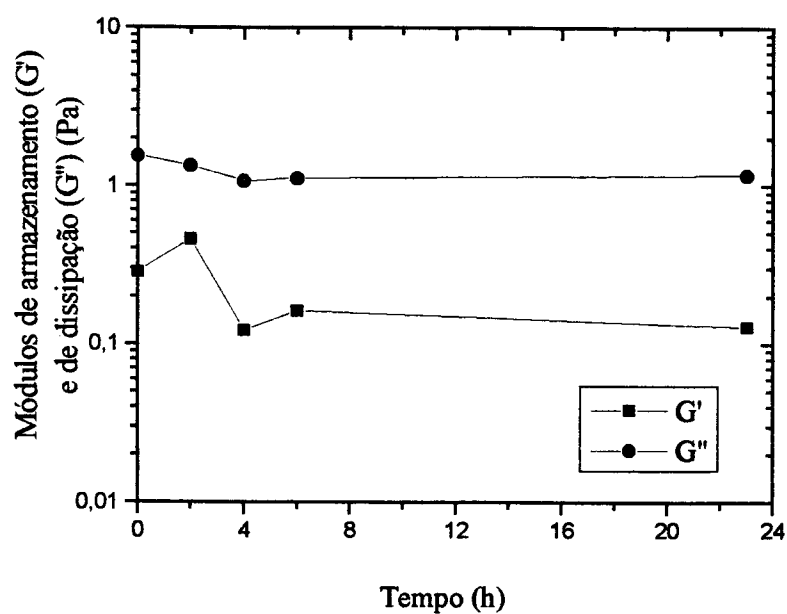


Figura 4.41 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura super-resfriada em função do tempo de estocagem a -12 °C .

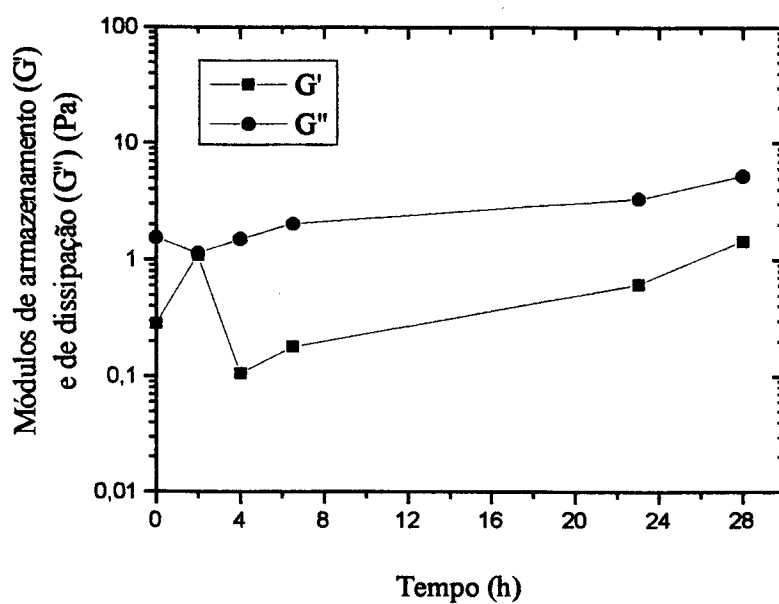


Figura 4.42 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura congelada em função do tempo de estocagem a -10 °C .

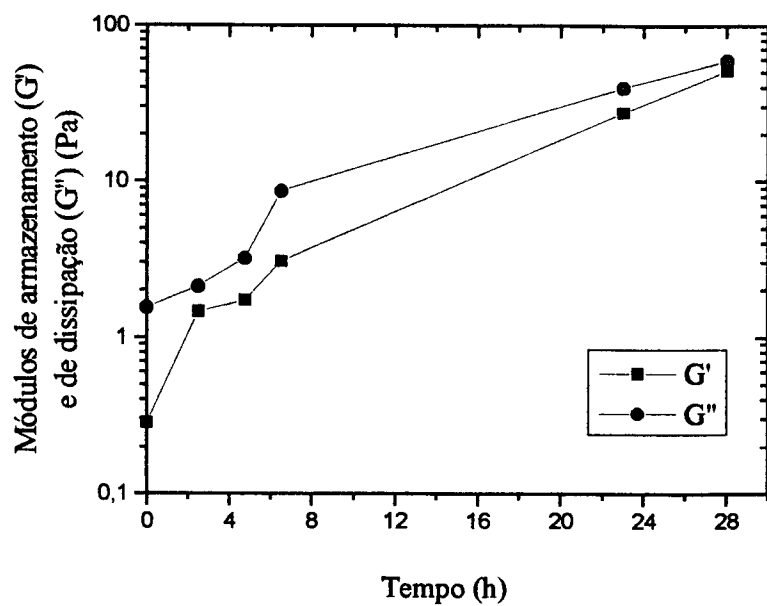


Figura 4.43 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema pura congelada em função do tempo de estocagem a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.3. Efeito de Aditivos

Cloreto de sódio (NaCl)

O NaCl é o aditivo mais utilizado, a nível industrial, com o intuito de evitar a gelificação da gema de ovo. Dessa maneira, procurou-se esclarecer o real efeito desse sal sobre as propriedades reológicas da gema congelada/descongelada. As Figuras 4.44 e 4.45 apresentam a variação dos módulos G' e G'' em função do tempo de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ para gema com 2 e 10% (em peso) de NaCl, respectivamente. As Figuras 4.46 e 4.47 mostram os valores de G' e G'' em função da porcentagem em peso do sal antes e depois de aproximadamente 26 horas de congelamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

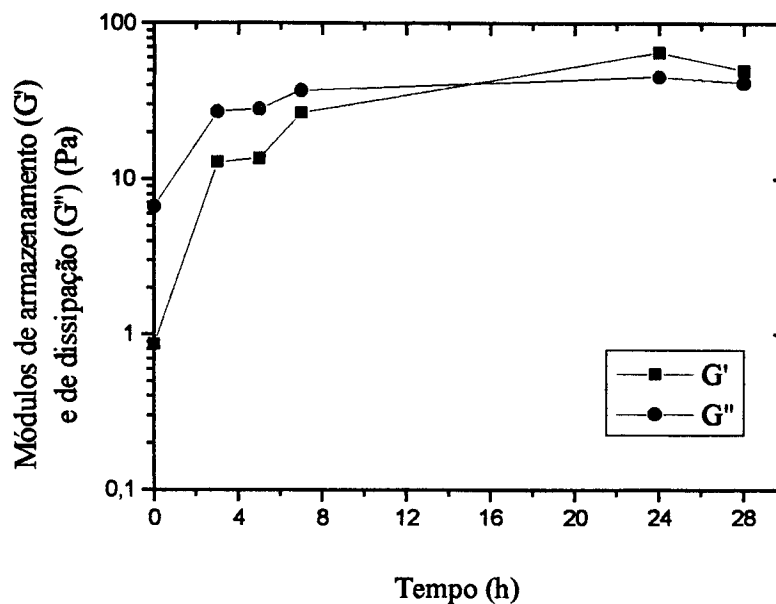


Figura 4.44 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de NaCl em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

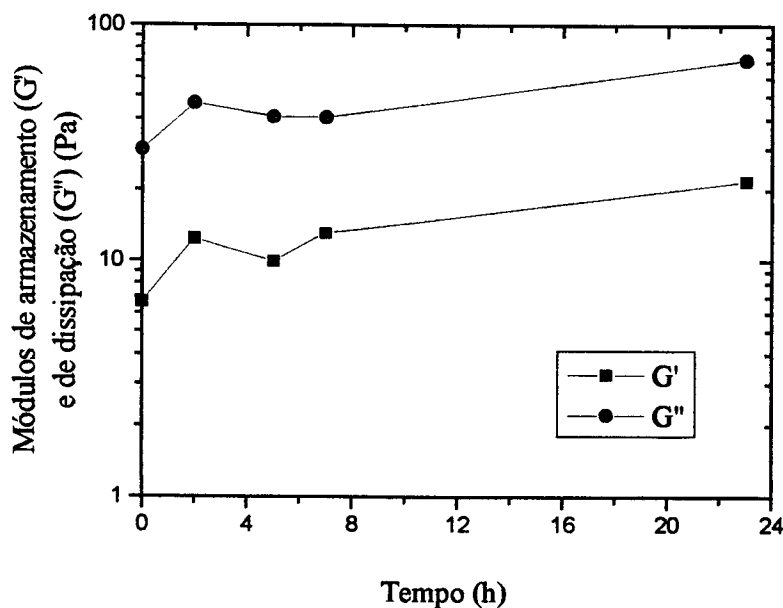


Figura 4.45 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 10% (em peso) de NaCl em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$

Verifica-se que 2% de NaCl não são suficientes para impedir a gelificação (Figuras 4.44 e 4.47) já que, após algum tempo de estocagem a baixa temperatura, G' torna-se maior que G'' . O aumento da concentração do sal para a faixa de 4 a 8% tem efeitos benéficos, garantindo um produto de maior fluidez após o descongelamento (Figura 4.47). É importante salientar que a adição de NaCl causa um aumento considerável no módulo de dissipação da gema, mesmo antes do congelamento, o que se observa claramente na Figura 4.46. O nível de 10% de NaCl, embora tenha evitado a gelificação, pois G' permanece praticamente constante durante o congelamento (Figura 4.45), é prejudicial ao produto, já que sua viscosidade é bastante afetada pelos altos valores de G'' . Esse resultado é muito importante, pois demonstra que a concentração de 10% de sal, comumente utilizada na indústria, poderia ser reduzida para valores entre 4 e 8%, com benefícios para o produto.

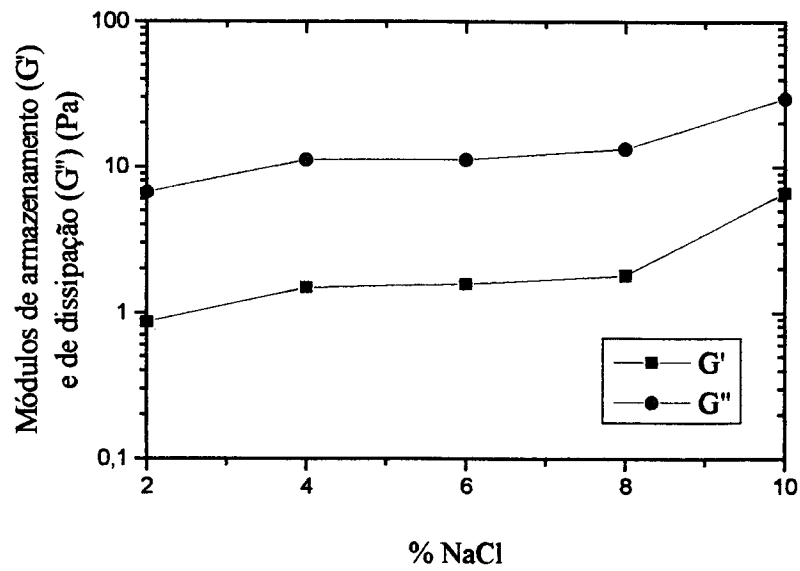


Figura 4.46 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de NaCl.

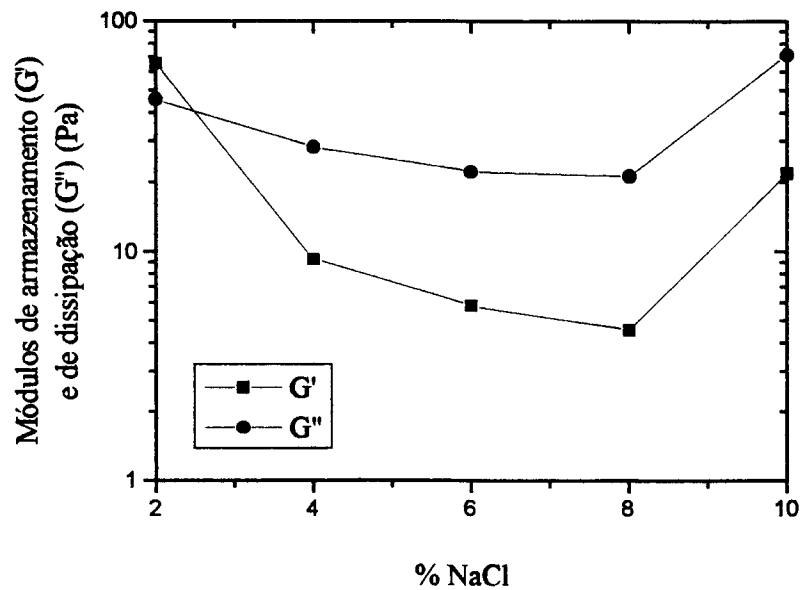


Figura 4.47 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema após 26 horas de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função da concentração (% em peso) de NaCl.

Resultados similares foram apresentados por CHANG et alii (1977) e POWRIE et alii (1963), embora o parâmetro analisado tenha sido a viscosidade aparente e, portanto, não foram feitas distinções entre as componentes elásticas e viscosas. É conveniente salientar que, nos trabalhos citados acima não foi destacado o fato de que o NaCl, quando utilizado ao nível de 10%, causa uma grande elevação na viscosidade do produto já antes do congelamento, mesmo que isso esteja bastante claro nos resultados apresentados e seja um ponto de grande importância em aplicações tecnológicas.

Sacarose

A sacarose é muito empregada na preparação da gema de ovo congelada destinada a produtos doces. Porém, o principal motivo para que se acrescente açúcar à gema antes do congelamento é impedir a gelificação. Na realidade, a sacarose demonstrou maior eficiência como crio-protetor que o NaCl. A influência da concentração dessa substância sobre G' e G'' pode ser observada nas Figuras 4.48 a 4.51.

Em primeiro lugar, constata-se que apenas 2% de sacarose são suficientes para impedir a gelificação, mantendo G' e G'' em níveis bem inferiores que os observados quando a gema pura é submetida ao mesmo tratamento.

Outro ponto importante, é que G'' permanece mais alto que G' durante todo o tempo de estocagem a baixa temperatura, demonstrando uma boa fluidez do material e a inexistência de agregados ou outro tipo de estrutura tridimensional com características elásticas (Figuras 4.48 e 4.49). Essas observações podem ser estendidas para maiores concentrações. Na faixa de 2 a 8% de sacarose, o aumento de concentração produz a elevação de seu efeito crio-protetor, como indica a Figura 4.51. Entretanto, não existe diferença significativa entre os resultados obtidos com 8 ou 10% de açúcar.

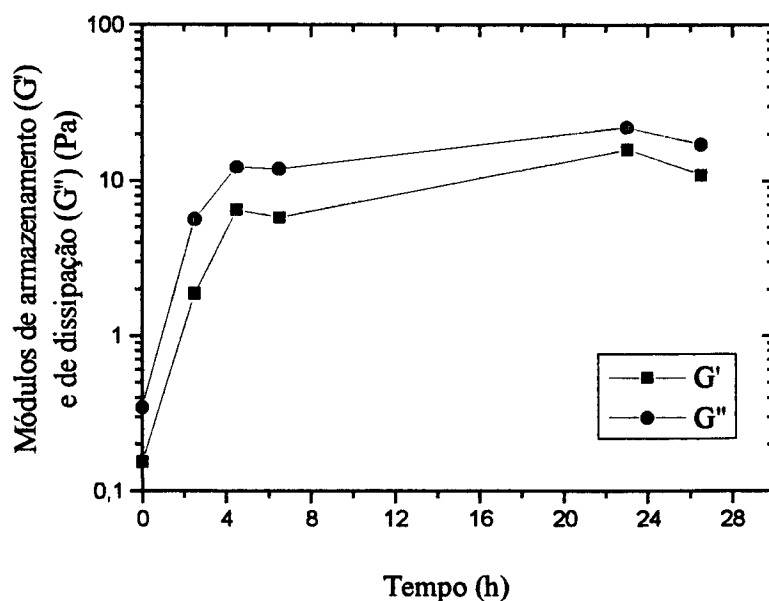


Figura 4.48 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de sacarose em função do tempo de estocagem a -24°C .

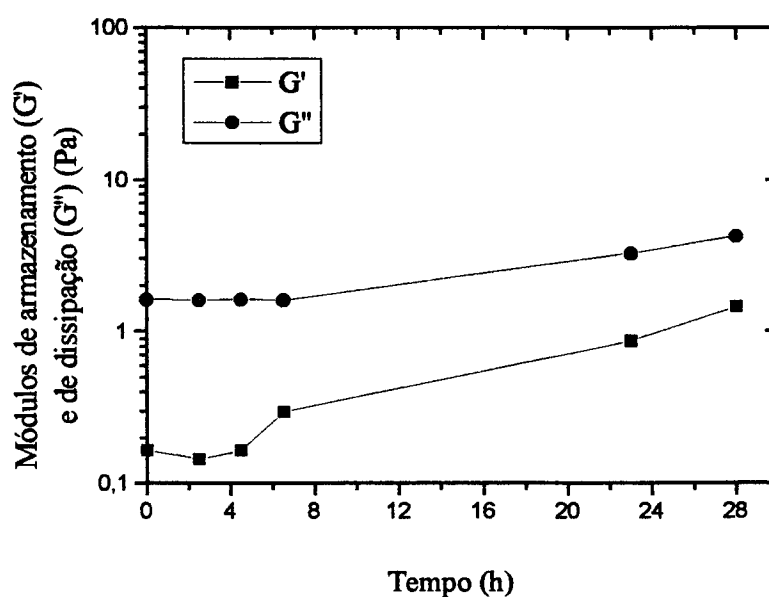


Figura 4.49 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 10% (em peso) de sacarose em função do tempo de estocagem a -24°C .

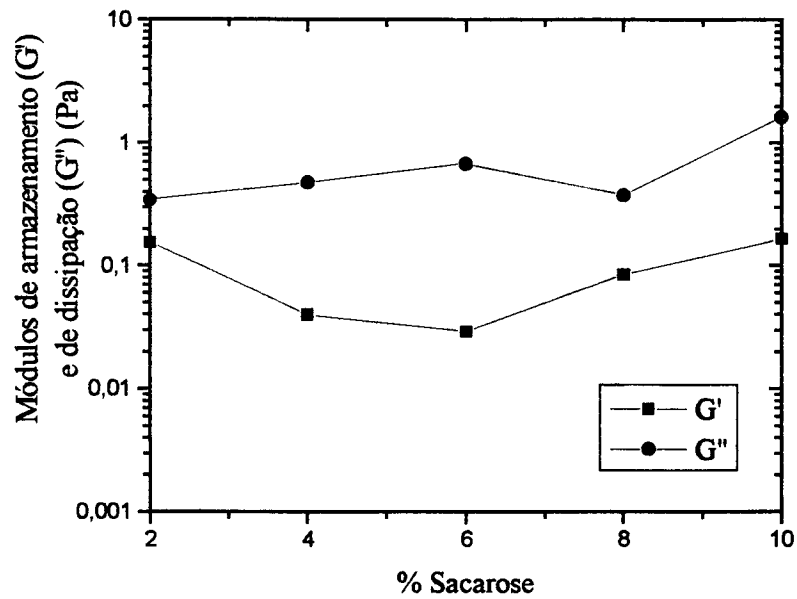


Figura 4.50 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de sacarose.

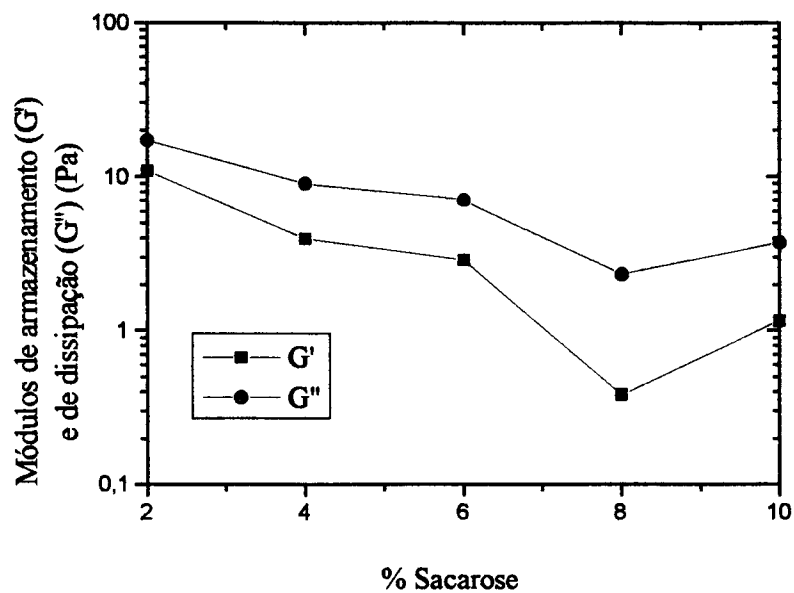


Figura 4.51 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema após 26 horas de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função da concentração (% em peso) de sacarose.

A sacarose tem a vantagem de, ao contrário do NaCl, não provocar alterações reológicas na gema antes do congelamento (Figura 4.50). Comparando-se as Figuras 4.50 e 4.51, observa-se uma elevação em G' e G'' após o congelamento, porém isso não compromete a facilidade de escoamento do produto.

O número de trabalhos publicados que discutem o efeito da sacarose sobre a gelificação é menor em relação ao NaCl. SOLIMAN & VAN DEN BERG (1971) consideram que o principal efeito desse açúcar, assim como o do NaCl, seria diminuir a concentração de fosfato na fase não-congelada, já que este é o íon presente em maior concentração na gema de ovo. Os resultados do presente trabalho, porém, indicam que o mecanismo de ação desses dois aditivos é bastante distinto.

NOWAK et alii (1966) observaram, em uma pesquisa sobre a interação de alaranjado de metila com a lipoproteína de baixa densidade, que a adição de sacarose à solução não teve influência sobre o número de moléculas do corante ligadas à lipoproteína, indicando que a sacarose não é adsorvida pela mesma. Esse resultado reforça a hipótese do mecanismo de exclusão preferencial proposto por ARAKAWA & TIMASHEFF (1982a e b) discutida no item 4.1.1 deste trabalho.

Glicerol

As propriedades crio-protetoras do glicerol são bastante conhecidas, embora seu mecanismo de atuação não tenha ainda sido esclarecido. Em relação às propriedades reológicas da gema de ovo, as Figuras 4.52 a 4.55 demonstram que seu efeito é equivalente ao da sacarose quando se trata de concentrações em peso.

O nível de 2% de glicerol, apesar de impedir a gelificação, mantendo G' sempre inferior a G'' , permite que ocorra um pequeno aumento desses parâmetros durante o congelamento (Figura 4.52). A adição de quantidades maiores de glicerol favorece o seu efeito crio-protetor (Figuras 4.53 e 4.55). Além disso, por se tratar de

um líquido, as amostras de gema glicerinadas apresentam maior fluidez em relação à gema pura mesmo antes do congelamento (Figura 4.54).

A ação do glicerol como crio-protetor em sistemas protéicos costuma ser comparada à da sacarose e outros carboidratos de baixo peso molecular. Entretanto, não existem estudos conclusivos a esse respeito.

SYCH et alii (1990) citam o trabalho de BACK et alii (1979), cuja conclusão é de que açúcares e polióis protegem a estrutura das proteínas contra os efeitos do aquecimento pelo seu efeito nas interações hidrofóbicas e admitem que, durante o congelamento, essas substâncias poderiam atuar de modo semelhante.

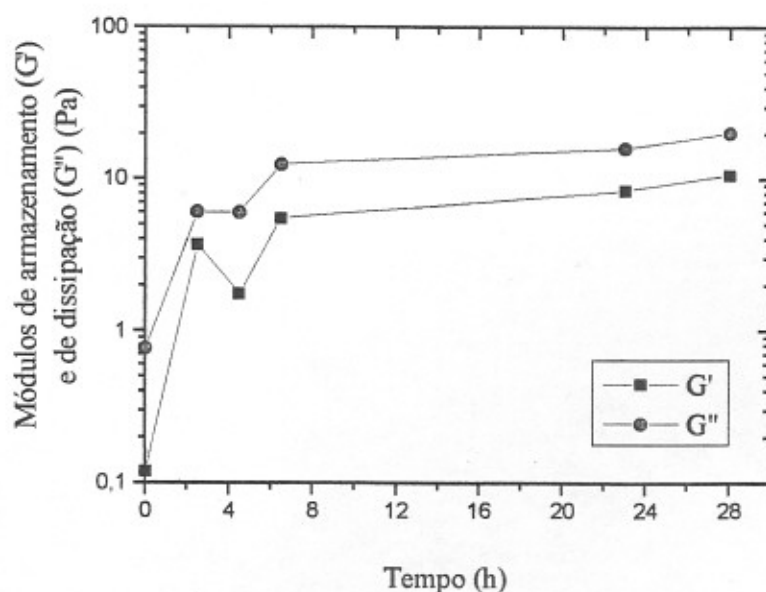


Figura 4.52 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de glicerol em função do tempo de estocagem a -24°C .

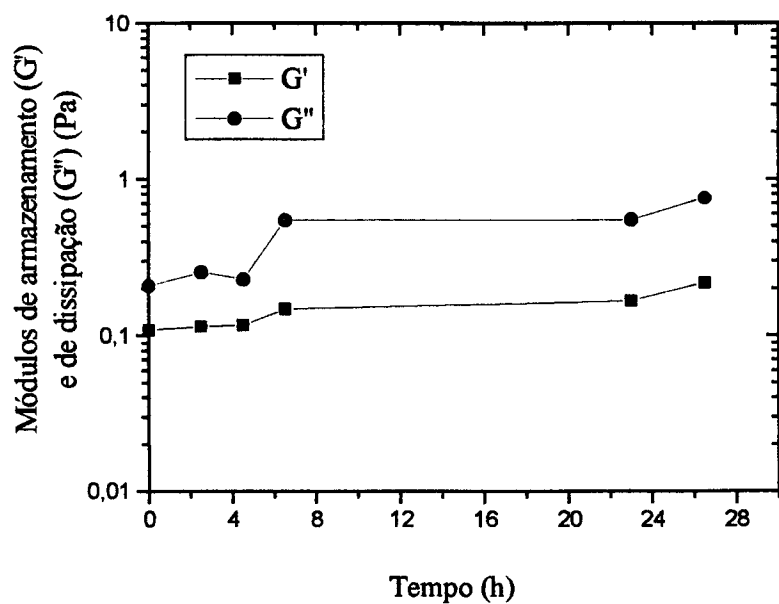


Figura 4.53 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 10% (em peso) de glicerol em função do tempo de estocagem a -24 °C .

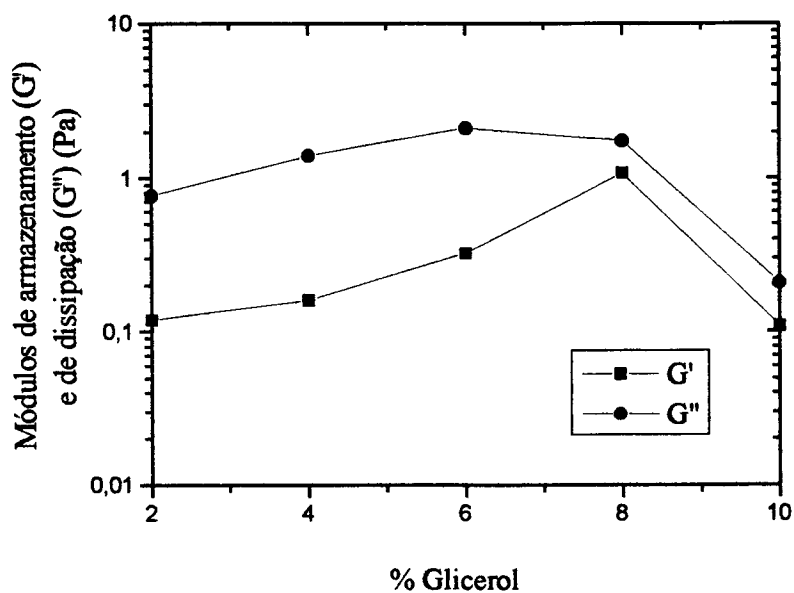


Figura 4.54 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de glicerol.

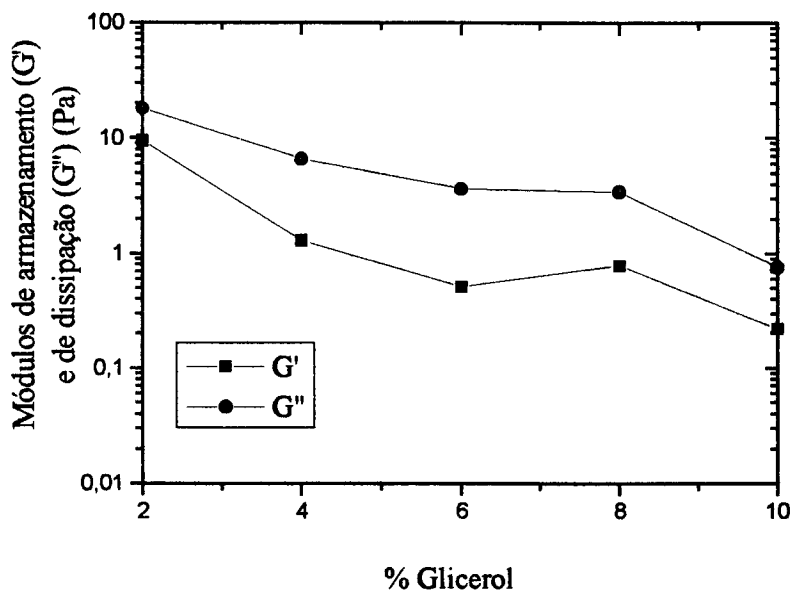


Figura 4.55 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema após 26 horas de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função da concentração (% em peso) de glicerol.

Cloreto de magnésio (MgCl_2)

O efeito do cloreto de magnésio sobre os parâmetros reológicos da gema de ovo submetida ao congelamento foi, de certa forma, surpreendente. Esperava-se que sua ação fosse similar à dos outros sais testados, porém observou-se que o comportamento das amostras de gema aditivadas com MgCl_2 é completamente diferente daquelas em que se acrescentou outros cloretos, como fica claro nas Figuras 4.56 a 4.59.

Pode-se afirmar que o cloreto de magnésio é um excelente crio-protetor. Apenas a amostra contendo 2% de MgCl_2 sofreu gelificação durante o congelamento mas, mesmo assim, a magnitude dos módulos G' e G'' após 28 horas de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ é pequena quando se compara com a gema pura submetida às mesmas condições. O aumento de concentração de 2 para 4% de sal foi suficiente para impedir a gelificação e manter os módulos de armazenamento e dissipação em níveis muito

semelhantes aos da gema em estado nativo. A elevação continuada do teor de cloreto de magnésio causa a manutenção dos módulos em valores sucessivamente mais baixos (Figuras 4.57 e 4.59).

O efeito do MgCl_2 demonstra que não é o íon cloreto que atua sobre as macromoléculas da gema, impedindo sua agregação e gelificação. Isso fica claro pelo comportamento completamente distinto exibido pelas amostras contendo NaCl , KCl , CaCl_2 e MgCl_2 . Para explicar a ação desses sais, deve-se buscar um mecanismo baseado nos respectivos cátions.

Resultados obtidos por SATO & AOKI (1975) confirmam a capacidade do cloreto de magnésio de impedir a agregação das moléculas de lipoproteína de baixa densidade durante o congelamento. Esses autores observaram que soluções de lipoproteína mantidas durante 20 horas a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ não apresentaram alterações de turbidez na presença desse sal. O confronto desses resultados com os do presente trabalho, obtidos com gema integral, reforçam a hipótese de que a lipoproteína de baixa densidade é a principal responsável pela gelificação.

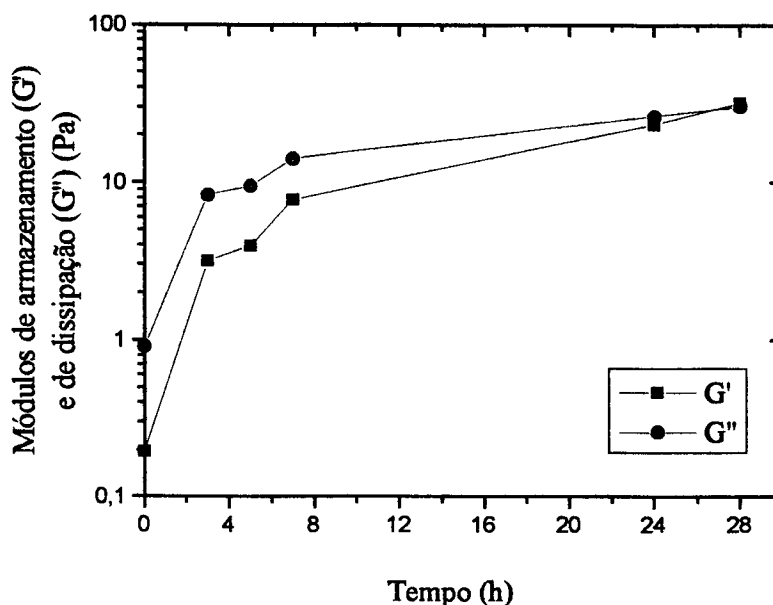


Figura 4.56 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de MgCl_2 em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^\circ\text{C}$.

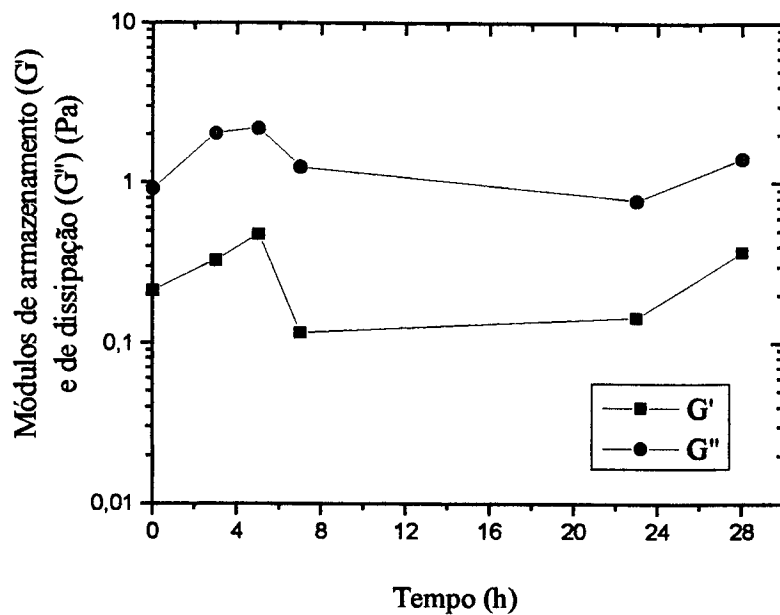


Figura 4.57 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 10% (em peso) de $MgCl_2$ em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

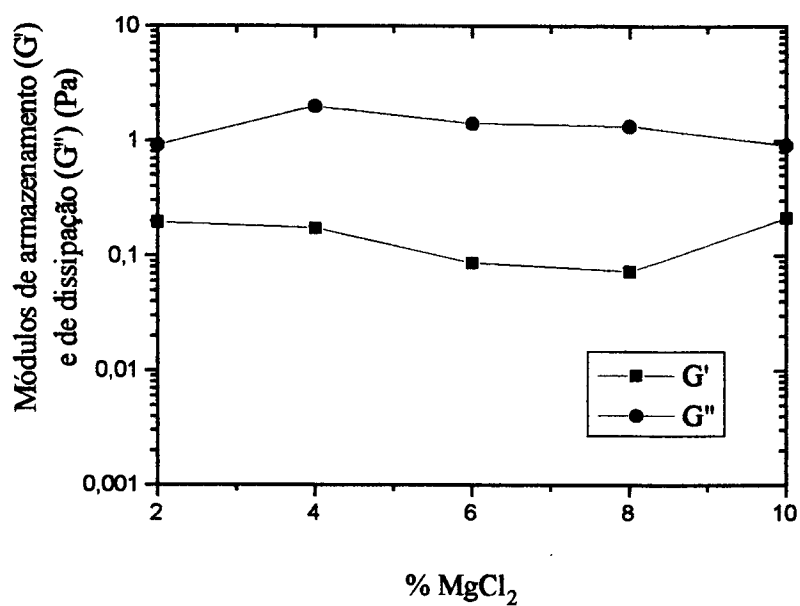


Figura 4.58 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de $MgCl_2$.

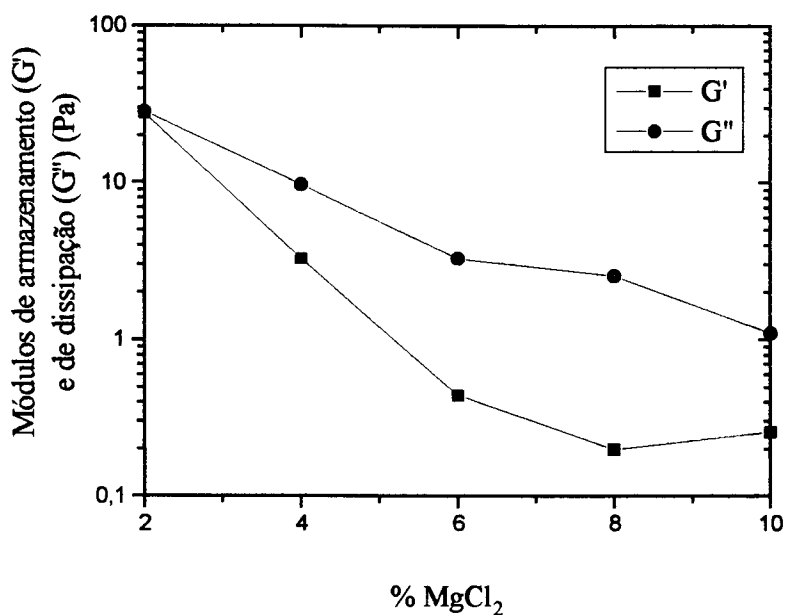


Figura 4.59 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema após 26 horas de armazenamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função da concentração (% em peso) de MgCl_2 .

Cloreto de potássio (KCl)

A determinação da influência do cloreto de potássio sobre as propriedades reológicas da gema congelada/descongelada apresentou problemas de ordem experimental. A adição de teores maiores que 2% (em peso) desse sal provoca uma grande elevação dos módulos de armazenamento e dissipação após o congelamento, ultrapassando o limite de sensibilidade do reômetro empregado (os limites de sensibilidade desse equipamento e as condições experimentais utilizadas estão expostos na seção 3.4 deste trabalho). Sendo assim, os únicos resultados confiáveis em relação a esse aditivo são apresentados nas Figuras 4.60 e 4.61.

Comparando-se o comportamento da gema com 2% de cloreto de potássio armazenada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4.60) com os resultados obtidos para 2% de NaCl (Figura 4.44), pode-se supor que a ação desses sais é muito semelhante, já que o formato das curvas é praticamente igual e a ordem de grandeza de G' e G'' é a mesma. Isso era esperado em função de serem, ambos, sais monovalentes bastante similares sob o ponto de vista de suas propriedades químicas. Entretanto, pela análise do

comportamento dos módulos em função da frequência (item 4.1.1 deste trabalho), verifica-se que estrutura da gema aditivada com KCl após o congelamento é completamente diferente daquela contendo NaCl.

A impossibilidade de quantificar, com precisão, o efeito de concentrações maiores de KCl dificulta uma análise mais completa. Entretanto, considerando as alterações dos módulos G' e G'' em função do teor de sal da gema sem congelar (Figura 4.61), conclui-se que o cloreto de potássio tem ação semelhante ao cloreto de sódio antes do congelamento, mas após a formação de gelo o íon K^+ parece potencializar o processo de gelificação.

São poucos os trabalhos que abordam a ação do potássio sobre a gema de ovo, entre eles o de SATO & AOKI (1975) e o de GRIZZUTI & PERLMANN (1970), sendo os resultados compatíveis com os aqui apresentados, como foi discutido no item 4.1.1. Porém, tais observações são insuficientes para que sua ação específica seja esclarecida. Pode-se afirmar, apenas, que sob o ponto de vista tecnológico, não existem vantagens no uso desse sal.

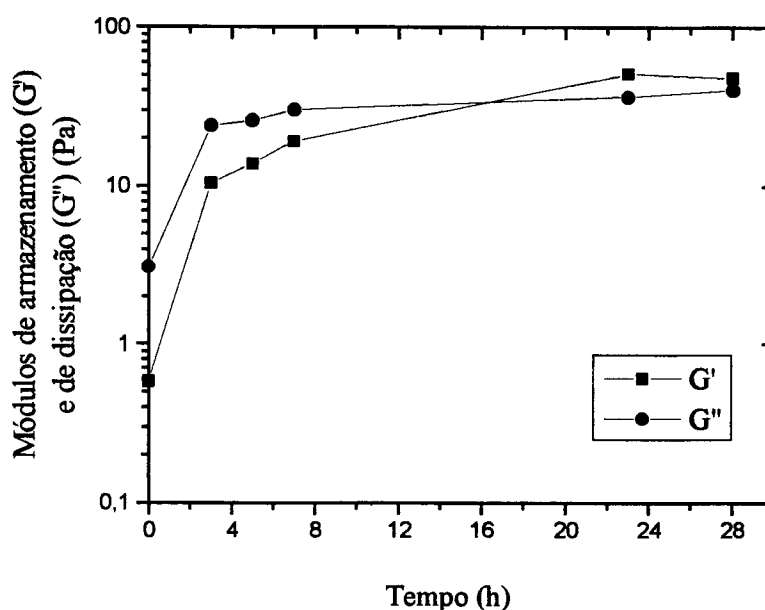


Figura 4.60 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de KCl em função do tempo de estocagem a -24 °C .

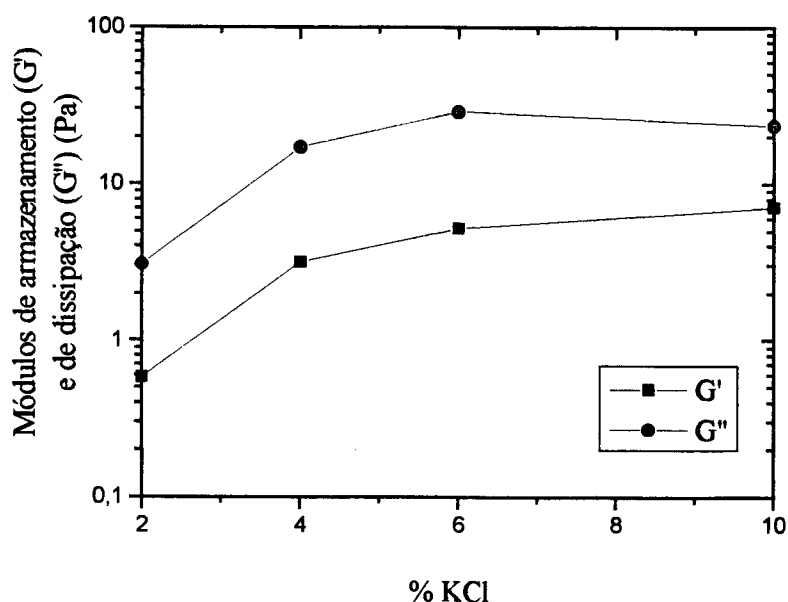


Figura 4.61 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de KCl.

Cloreto de cálcio (CaCl_2)

O cloreto de cálcio, apesar de ser um sal de cátion divalente como o cloreto de magnésio, tem efeito completamente oposto ao desse último. Sua ação é favorável à gelificação após o congelamento, como mostra a Figura 4.62. Apenas 2% (em peso) de CaCl_2 fazem com que o módulo de armazenamento sofra uma grande elevação, tornando-se bem maior que o módulo de dissipação já após as primeiras horas de estocagem a baixa temperatura, indicando o surgimento de interações moleculares catalisadas pela presença do cátion Ca^{2+} e responsáveis pelo desenvolvimento de uma estrutura altamente elástica. O módulo de dissipação sofre um crescimento inicial nas primeiras horas do congelamento e, em seguida, passa por uma redução. Isso reforça a conclusão de que o que mais contribui para o comportamento reológico da amostra são interações de caráter elástico.

A adição desse cloreto é responsável pela alteração dos parâmetros G' e G'' da gema antes do congelamento, elevando-os em função do aumento de sua concentração (Figura 4.63). No entanto, nessas condições verifica-se a predominância

do módulo de dissipação, o que leva à conclusão de que o cálcio contribui para o entrelaçamento das moléculas e a formação de gelo reforça esse efeito.

Esse tipo de ação já era esperada, uma vez que o cálcio é um agente de coagulação de proteínas, principalmente as derivadas do leite. DICKSON & PERKINS (1971) demonstraram que a caseína do leite tem grande afinidade pelo íon Ca^{2+} e que os prováveis sítios de ligação seriam os grupos monoéster fosfato dos resíduos serina e treonina e os grupos carboxila dos ácidos aspártico e glutâmico. Esses autores afirmam que a fosvitina da gema de ovo, que contém aproximadamente 10% de fósforo, também na forma de monoéster fosfato de resíduos serina, teria a mesma afinidade pelo cálcio.

A determinação dos parâmetros reológicos de amostras congeladas com teores mais altos de CaCl_2 não foi possível pelo mesmo motivo exposto em relação ao KCl , isto é, os módulos G' e G'' superaram o limite de sensibilidade do reômetro.

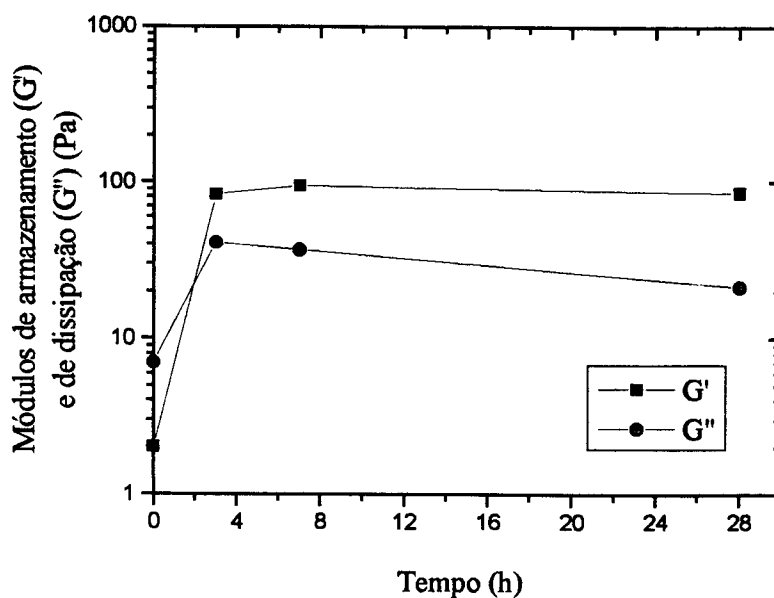


Figura 4.62 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema com 2% (em peso) de CaCl_2 em função do tempo de estocagem a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

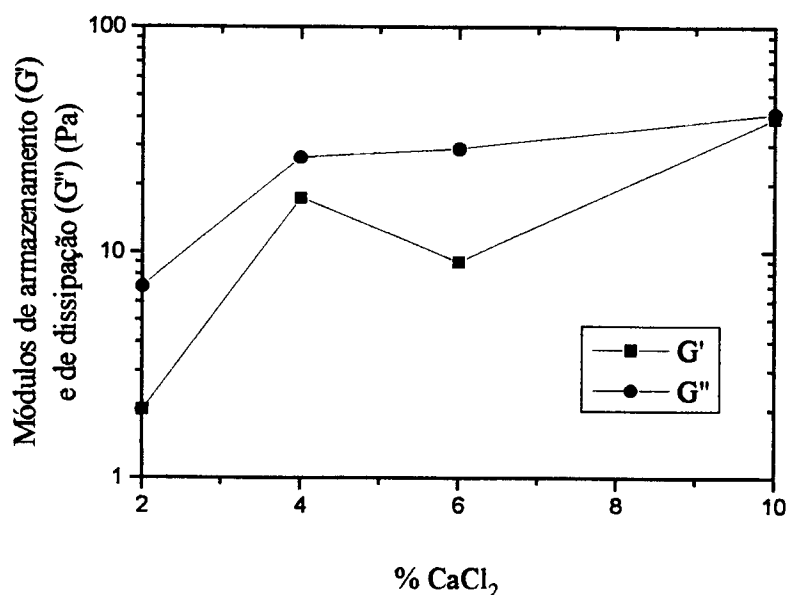


Figura 4.63 - Módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') para gema sem congelar em função da concentração (% em peso) de CaCl_2 .

A Tabela 4.4 apresenta um resumo da ação dos aditivos testados sobre as propriedades viscoelásticas da gema, de forma a facilitar a análise dos resultados apresentados.

Tabela 4.4 - Efeitos dos aditivos sobre as propriedades viscoelásticas da gema antes e após o congelamento..

ADITIVO	EFEITO
NaCl	Impede a gelificação mas aumenta a viscosidade, mesmo antes do congelamento.
KCl	Antes do congelamento, seu efeito é semelhante ao do NaCl, isto é, aumenta a viscosidade. Durante o congelamento, potencializa a gelificação.
MgCl_2	Em concentrações superiores a 2% em peso, evita a gelificação, sem provocar aumento de viscosidade.
CaCl_2	Provoca aumento da viscosidade antes do congelamento e acelera a gelificação durante o mesmo.
Sacarose	Concentrações de apenas 2% são suficientes para evitar a gelificação.
Glicerol	Seu efeito é semelhante ao da sacarose.

4.2. Temperatura de Transição Vítrea

A temperatura de transição vítrea da matriz maximamente concentrada (T_g') da gema de ovo foi determinada a partir de termogramas obtidos em um calorímetro diferencial de varredura, segundo o procedimento apontado por SLADE & LEVINE (1991). Esses autores propõem o uso de gráficos da derivada do fluxo de calor em função da temperatura da amostra. Esse método permite uma avaliação mais precisa da temperatura de transição vítrea, uma vez que a quantidade de energia envolvida nesse tipo de transição é bastante pequena, dificultando a identificação de T_g' se, no mesmo termograma aparecem outras transições, como por exemplo a fusão do gelo durante o descongelamento.

Os ensaios de calorimetria diferencial de varredura foram realizados no equipamento pertencente ao Instituto de Química/UNICAMP. O Apêndice B apresenta os termogramas completos obtidos e, nesta seção, são incluídos os mais representativos.

A Figura 4.64 apresenta o termograma obtido para a gema pura após congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e descongelamento a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. No caso de soluções aquosas congeladas, como pode ser considerada a gema de ovo, a transição vítrea ocorre em temperaturas abaixo de zero mas, devido à presença do pico correspondente à fusão do gelo que obriga a utilização de uma escala pequena, praticamente não pode ser observada. Uma ampliação do termograma na faixa de temperaturas de interesse, apresentada na Figura 4.65, possibilita a visualização de duas pequenas transições, explicitadas em um gráfico da derivada do fluxo de calor (ordenada da Figura 4.65) em função da temperatura (abscissa da mesma figura), como mostra a Figura 4.66. ROOS (1992), em uma revisão sobre transições de fases em materiais alimentícios, também utiliza o recurso da ampliação do termograma para facilitar a determinação de T_g' .

SLADE & LEVINE (1991) apresentam gráficos desse tipo para soluções de glucose e maltodextrina, onde pode-se comprovar a correspondência dos picos da Figura 4.66 com T_g' (indicada na figura) e T_g (pico endotérmico à esquerda de T_g'). A temperatura T_g' corresponde ao ponto em que ocorre a transição vítrea da matriz maximamente concentrada, isto é, onde a água que permanece no estado líquido é considerada como não-congelável. Esses conceitos encontram-se mais detalhados nos itens 2.3 e 4.1.2 deste trabalho.

Pela Figura 4.66 conclui-se que T_g' para a gema de ovo pura fica em torno de $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (249,1 K) e, em outro ensaio, apresentado nas Figuras 4.67 e 4.68, correspondente à gema pura em estado nativo, este valor é confirmado.

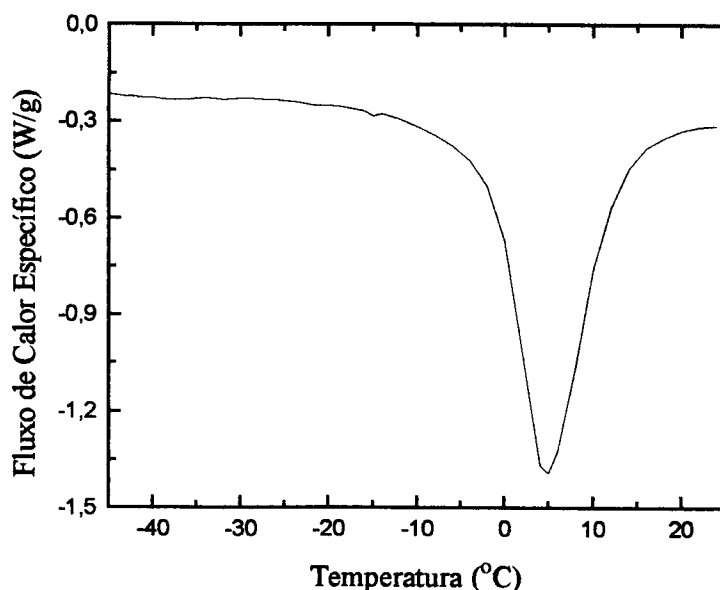


Figura 4.64 - Termograma para gema pura congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e descongelada a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos.

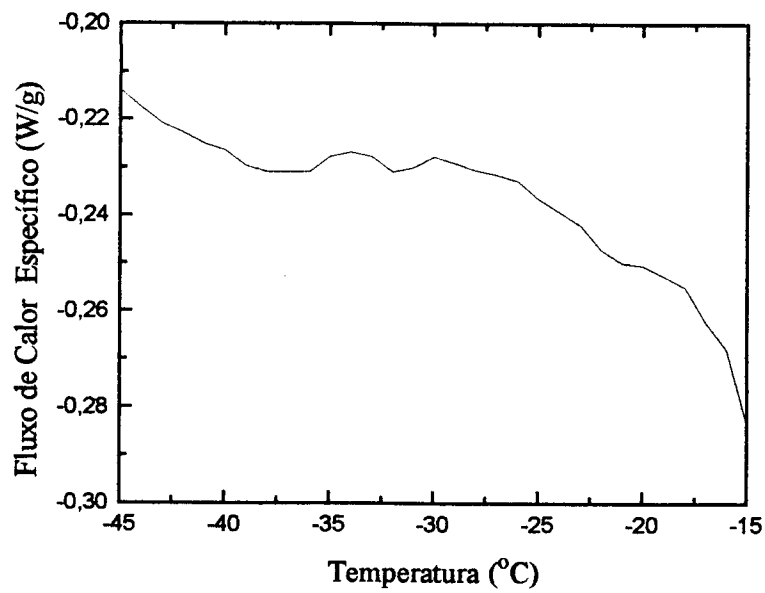


Figura 4.65 - Ampliação do termograma apresentado na Figura 4.64.

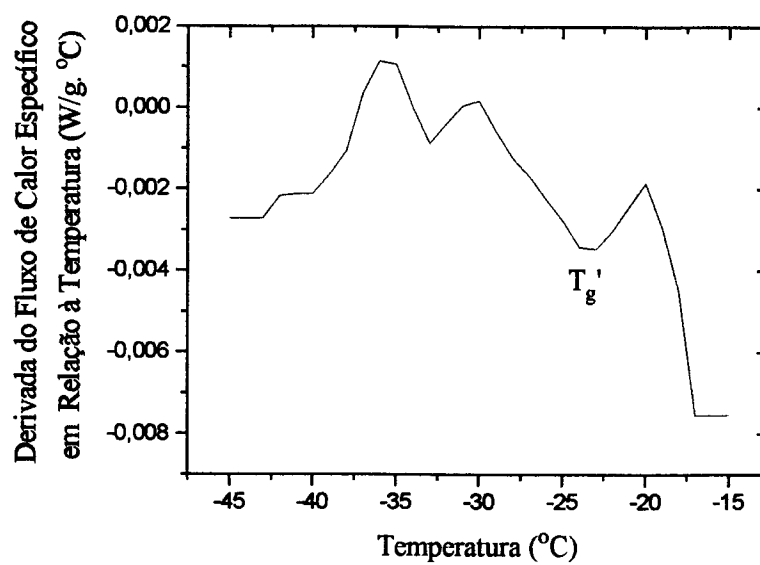


Figura 4.66 - Derivada do fluxo de calor específico em função da temperatura, correspondente ao termograma da Figura 4.64.

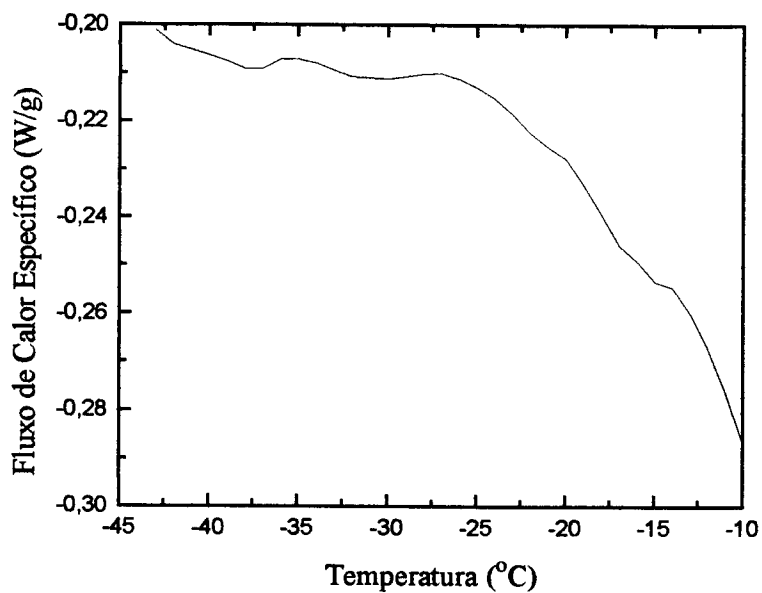


Figura 4.67 - Termograma (ampliado) correspondente à gema pura em estado nativo.

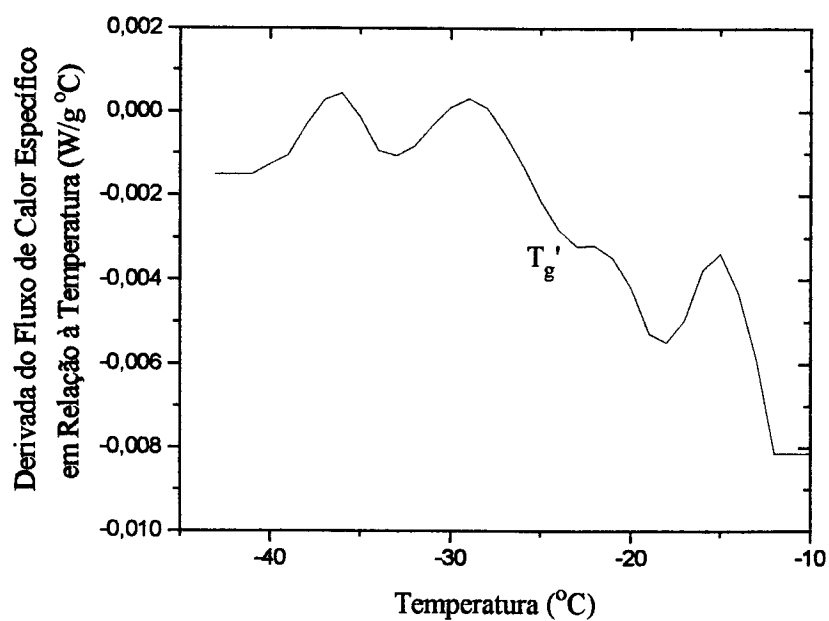


Figura 4.68 - Derivada do fluxo de calor específico em função da temperatura, correspondente ao termograma da Figura 4.67.

Infelizmente, a determinação experimental de T_g' em sistemas complexos, como os materiais alimentícios reais, não é fácil. Devido à quantidade reduzida de energia envolvida na transição, é necessária uma grande estabilidade da linha base do termograma para que os resultados sejam obtidos com segurança. Esse problema de ordem prática já foi levantado por SIMATOS et alii (1989), que consideram necessárias maiores evidências experimentais para que a teoria da crioestabilização de LEVINE & SLADE (1989) seja totalmente aceita.

Na tentativa de confirmar os resultados acima, foram feitas outras análises calorimétricas, seguindo o mesmo procedimento e foi impossível a identificação da transição vítrea, mesmo com o uso das derivadas, como mostram as Figuras 4.69 e 4.70.

Entretanto, os resultados dos ensaios reológicos são compatíveis com um valor de T_g' igual a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, como foi discutido no item 4.2.1. Assim, é aconselhável a realização de novos experimentos para confirmar ou não a existência dessa transição na gema de ovo.

Também foram obtidos termogramas para a gema com sacarose e com os sais NaCl, KCl, MgCl_2 e CaCl_2 , ao nível de 10% em peso. Esses termogramas são apresentados nas Figuras 4.71 a 4.75. A partir desses resultados, seguindo o procedimento acima, determinou-se as temperaturas de transição vítrea da matriz maximamente concentrada, as quais encontram-se na Tabela 4.5.

Todos os aditivos testados provocaram a redução de T_g' , o que está de acordo com a teoria (LEVINE & SLADE, 1988), já que se trata de substâncias de baixo peso molecular e que, portanto, provocam a diminuição do peso molecular médio da mistura (gema aditivada). Considerando que os ensaios de congelamento da gema com qualquer um dos aditivos foram realizados a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, isto é, no estado borrachoso e, mesmo assim, houve impedimento da gelificação em alguns casos (item 4.1.3), pode-se admitir que o efeito de tais aditivos vai além da influência na temperatura de transição vítrea, reforçando a idéia de que existe uma interação específica entre cada uma das substâncias testadas e as lipoproteínas da gema.

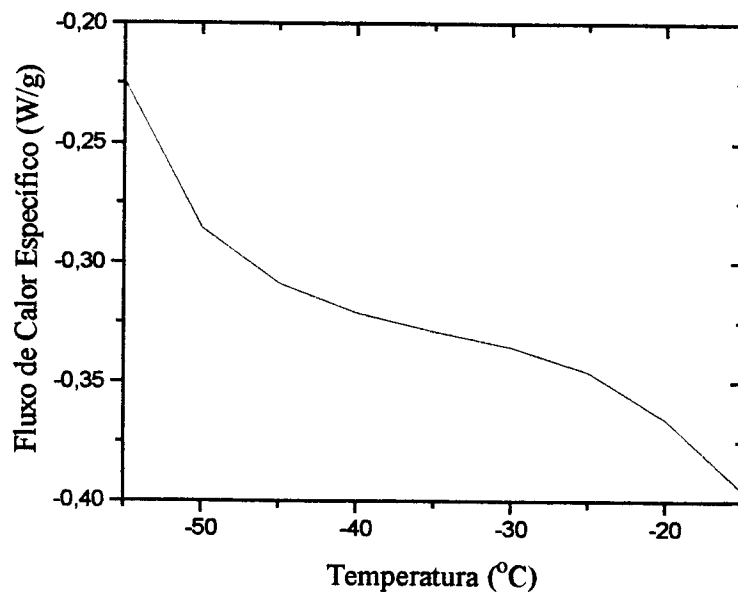


Figura 4.69 - Termograma (ampliado) correspondente à gema pura em estado nativo (primeira repetição).

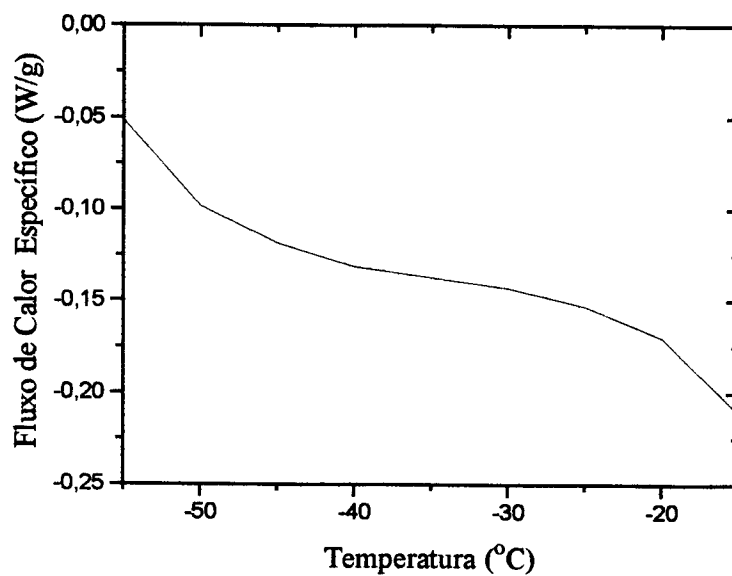


Figura 4.70 - Termograma (ampliado) correspondente à gema pura em estado nativo (segunda repetição).

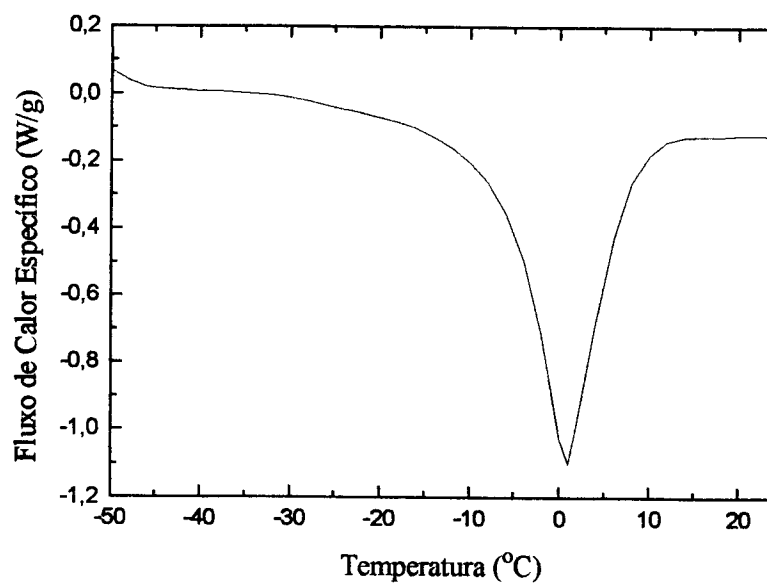


Figura 4.71 - Termograma para gema com 10% (em peso) de sacarose.

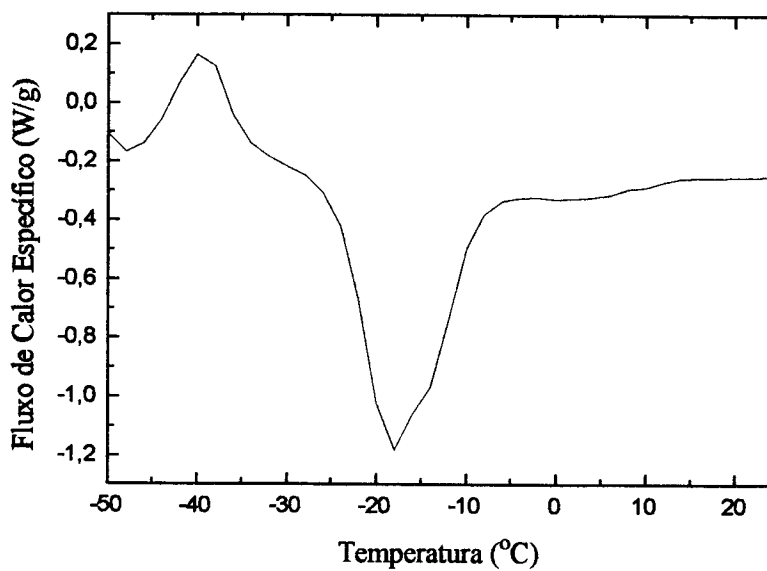


Figura 4.72 - Termograma para gema com 10% (em peso) de NaCl.

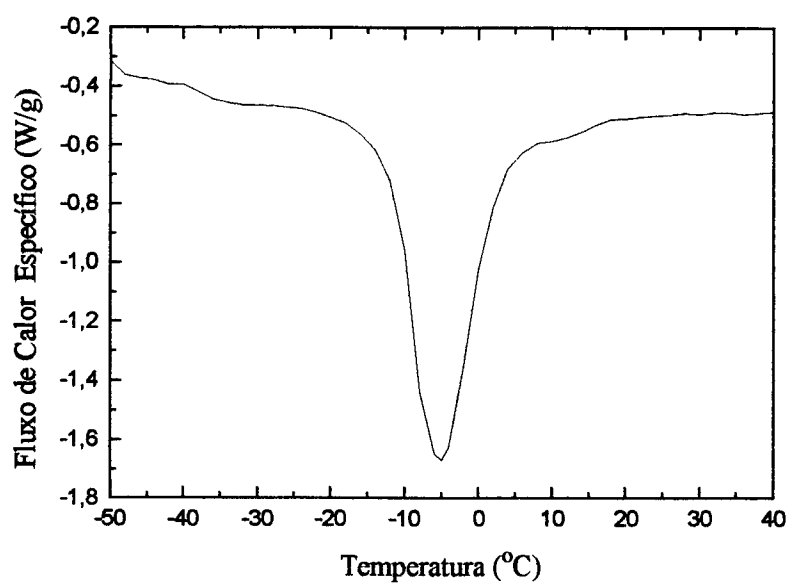


Figura 4.73 - Termograma para gema com 10% (em peso) de KCl.

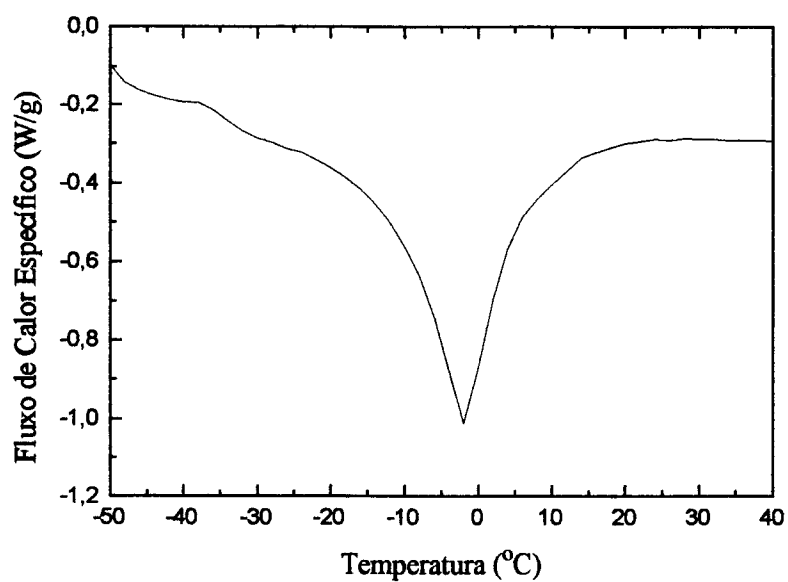


Figura 4.74 - Termograma para gema com 10% (em peso) de MgCl₂.

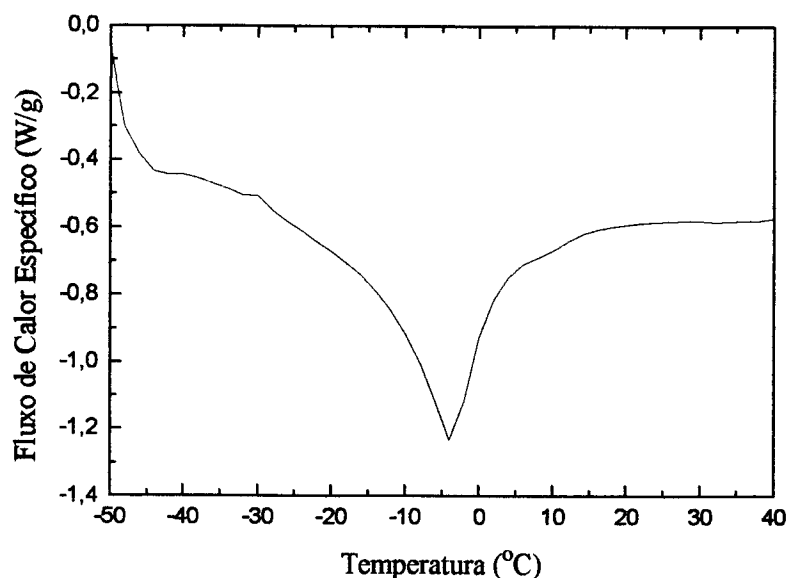


Figura 4.75 - Termograma para gema com 10% (em peso) de CaCl_2

O termograma correspondente à gema com 10% de NaCl (Figura 4.72) mostra a presença de outra transição endotérmica de primeira ordem (pico mais à esquerda), além da fusão do gelo. Trabalhos anteriores (ROOS, 1992, WAKAMATU et alii, 1983) apresentam resultados semelhantes e atribuem esse segundo pico à fusão da mistura eutética formada no congelamento.

Tabela 4.5 - T_g' para gema com aditivos ao nível de 10% em peso.

ADITIVO	T_g' (°C)
Sacarose	-28
NaCl	-38
KCl	-38
MgCl_2	-36
CaCl_2	-28

4.3. Temperatura de Início de Congelamento

O conhecimento da temperatura de início de congelamento (T_{ic}) da gema tratada com os diversos aditivos é um parâmetro importante para confirmar se houve ou não formação de cristais de gelo nas amostras congeladas em determinada temperatura, uma vez que a formação de gelo é um dos fatores responsáveis pela gelificação como foi demonstrado no item 4.1.2. Além disso, o ponto de início de congelamento é necessário para a determinação da fração de água não congelada através de medidas de entalpia das amostras. Os valores de T_{ic} para a gema pura e com aditivos determinados experimentalmente são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Temperaturas de início de congelamento (T_{ic}) da gema de ovo.

ADITIVO	CONCENTRAÇÃO (% em peso)	T_{ic} (°C)
pura	—	$-0,7 \pm 0,1$
NaCl	2%	$-4,1 \pm 0,1$
NaCl	4%	$-7,8 \pm 0,1$
NaCl	6%	$-10,6 \pm 0,1$
NaCl	8%	$-13,8 \pm 0,1$
NaCl	10%	$-17,9 \pm 0,1$
NaCl	11%	$-20,7 \pm 0,1$
NaCl	12%	$-22,6 \pm 0,1$
Sacarose	2%	$-1,2 \pm 0,1$
Sacarose	10%	$-3,0 \pm 0,1$
Glicerol	2%	$-2,2 \pm 0,1$
Glicerol	10%	$-6,5 \pm 0,1$
MgCl ₂	2%	$-0,9 \pm 0,1$
MgCl ₂	10%	$-6,4 \pm 0,1$
KCl	2%	$-2,8 \pm 0,1$
KCl	10%	$-8,9 \pm 0,1$
CaCl ₂	2%	$-1,7 \pm 0,1$
CaCl ₂	10%	$-6,6 \pm 0,1$

É interessante notar que, na indústria, a concentração de NaCl adicionada à gema pode, quando solicitado pelo cliente, ultrapassar os 10% em peso. Nesse caso, observa-se na Tabela 4.6 que a temperatura de início de congelamento é inferior a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, em temperaturas usuais de armazenagem frigorificada, o produto pode não estar congelado, o que certamente causará prejuízos em sua qualidade.

4.4. Fração de Água Congelada

A fração de água congelada na gema pura e com aditivos em função da temperatura de congelamento foi determinada, experimentalmente, pelo método calorimétrico, de acordo com o que foi exposto no item 3.8.

Para calcular as variações de entalpia e as frações de água congelada, é necessário conhecer os valores do calor específico do produto descongelado e totalmente congelado. Neste trabalho foram adotados os resultados obtidos por RIEDEL (1957) que apresenta dados de C_p em função da temperatura e do conteúdo de umidade para a gema de ovo. Para o produto congelado, o valor de C_{p_c} foi considerado igual a $0,41\text{ kcal/kg }^{\circ}\text{C}$ e, para o produto descongelado, C_{p_p} foi considerado igual a $0,83\text{ kcal/kg }^{\circ}\text{C}$.

Para os cálculos referentes à gema com aditivos, foram adotados valores de calor específico iguais ao da gema pura congelada e descongelada.

Os valores de entalpia da gema pura obtidos experimentalmente, tendo como referência ($H = 0$) o produto descongelado na temperatura de início de congelamento (T_{ic}), são apresentados na Figura 4.76 e na Tabela 4.7. Também foram incluídos os valores obtidos pela equação de SCHWARTZBERG (1981), que tem como variável independente a temperatura da amostra (T_p) e o coeficiente b como parâmetro de ajuste, sendo dada por:

$$H = (T_p - T_{ic}) \left\{ C_{p_c} + \frac{[n_{w0} - b(1 - n_{w0})] \Delta H_w}{(T_w - T_p)} \right\} \quad (4.4)$$

onde

T_w = temperatura de congelamento da água pura

ΔH_w = calor latente de fusão da água pura

b = fração de água ligada

n_{w0} = fração mássica inicial de água, igual a (%UBU/100)

C_{p_c} = calor específico do produto completamente congelado

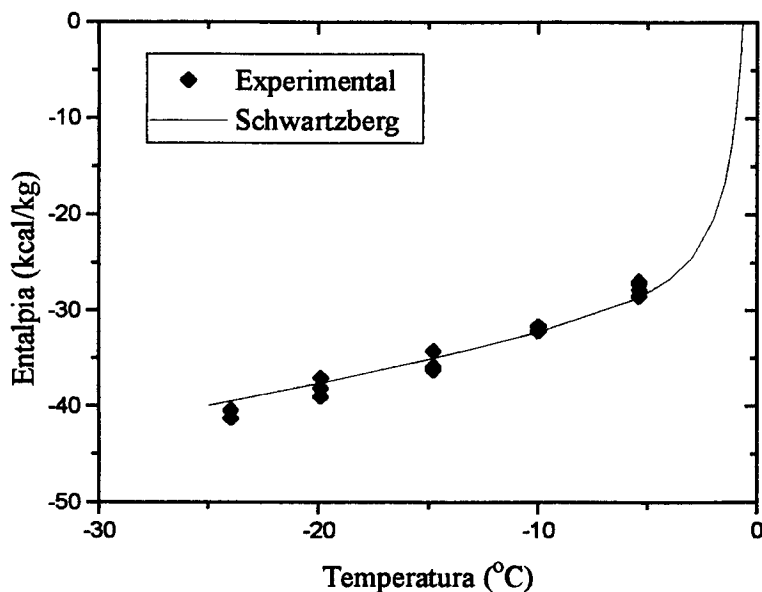


Figura 4.76 - Valores de entalpia para a gema pura experimentais e estimados pela equação proposta por SCHWARTZBERG (1981).

Para o cálculo da entalpia pela equação 4.4, os valores do calor latente de fusão e da temperatura de congelamento da água pura foram tomados como sendo, respectivamente, 79,2 kcal/kg e 0 °C. Para a temperatura de início de congelamento da amostra foi adotado o valor de -0,7 °C, determinado experimentalmente. Também para

a fração mássica de água foram empregados os valores experimentais. O valor de C_p foi obtido no trabalho de RIEDEL (1957), a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo igual a $0,41\text{ kcal/kg }^{\circ}\text{C}$.

O coeficiente b é definido como sendo a fração de água ligada, isto é, de água não congelável. Em produtos alimentícios cujo teor de umidade inicial é superior a 90%, é possível assumir com razoável precisão que b não varia com a temperatura. No entanto, isso não é verdade em materiais com menor fração de água. Segundo RIEDEL (citado por SCHWARTZBERG, 1981), a quantidade de água ligada deve estar em equilíbrio com a fração de água em solução e, portanto, é provável que b diminua à medida que a temperatura é reduzida. Foi exatamente esse o comportamento observado para a gema de ovo, que tem umidade em torno de 48%.

Tabela 4.7 - Valores de entalpia para a gema pura: experimentais e estimados pela equação proposta por SCHWARTZBERG (1981).

T ($^{\circ}\text{C}$)	%UBU	H_p (kcal/kg) (Experim.)	H_p (kcal/kg) (Eq. 4.4)	b	n_p (% de água congelada)
-5,4	48,32	$-27,54 \pm 0,70$	-28,61	$0,22 \pm 0,02$	$64,84 \pm 1,82$
-10,0	48,20	$-31,74 \pm 0,31$	-32,23	$0,20 \pm 0,01$	$69,85 \pm 0,82$
-14,8	48,29	$-35,37 \pm 1,07$	-34,99	$0,18 \pm 0,03$	$73,00 \pm 2,79$
-19,9	48,36	$-38,02 \pm 0,98$	-37,54	$0,17 \pm 0,02$	$73,56 \pm 2,57$
-24,0	48,36	$-40,66 \pm 0,46$	-39,42	$0,16 \pm 0,01$	$75,43 \pm 1,20$

Na Tabela 4.7, os valores de b correspondem aos valores calculados pela equação 4.4, substituindo em H_p os valores determinados experimentalmente. A partir desses dados foi calculada a média aritmética, que resultou em $b = 0,186$. Esse valor foi novamente introduzido na equação 4.4 para a obtenção de novos valores de entalpia, representados pela curva da Figura 4.76. Verifica-se que existe uma boa concordância entre os valores experimentais e estimados na faixa de -5 a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, entretanto, o valor de b é consideravelmente inferior ao relatado por RIEDEL (1957), que obteve $b = 0,40$ para a gema de ovo. Esse fato não é de todo surpreendente, uma

vez que, segundo SCHWARTZBERG (1981), os valores de RIEDEL para produtos como carne, filé de peixe e vegetais, têm sido considerados muito altos. Além disso, existe o fato de que para produtos de umidade intermediária, o valor de b não é constante.

Os valores experimentais da fração de água congelada também são apresentados na Tabela 4.7. Em relação ao trabalho de RIEDEL (1957), esses resultados são bastante subestimados. Segundo esse autor, a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a fração de água congelada já é igual a 67% e, quando a temperatura atinge $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, apenas 12% da água presente no produto ainda se encontra na fase líquida (Anexo A).

Alguns autores já tentaram explicar o processo de gelificação sob o ponto de vista da influência do teor de água não-congelada (CHANG et alii, 1977; POWRIE, 1973). Contudo, esse não deve ser o único fator envolvido no processo, uma vez que neste trabalho foi comprovado que a gema congelada e armazenada em temperaturas mais baixas ($-38\text{ }^{\circ}\text{C}$) e, portanto, com maior fração de gelo formado, manteve-se mais fluida do que aquela armazenada em temperaturas superiores.

Empregando o mesmo método calorimétrico já descrito, foram determinados experimentalmente os valores de entalpia e fração de água não congelada para a gema com aditivos, nos níveis de 2 e 10%, na temperatura de $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, os quais são apresentados na Tabela 4.8. Não se encontrou dados de outros autores com os quais se possa comparar os resultados.

Em relação ao processo de gelificação, não é possível correlacionar a fração de água congelada em função da presença de cada aditivo com sua capacidade de evitar a alteração dos parâmetros reológicos. WAKAMATU et alii (1983) determinaram a fração de água congelada em soluções de lipoproteína de baixa densidade e relacionaram a gelificação com a remoção da água na forma de gelo. Entretanto, os resultados do presente trabalho demonstram que os parâmetros reológicos são suscetíveis a alterações muito mais acentuadas do que fariam supor as diferenças nas frações de água congelada na presença de cada aditivo. Por exemplo, as frações de água congelada nas amostras que contêm 2 e 10% em peso de cloreto de

magnésio são semelhantes àsquelas das amostras com 2 e 10 % em peso de cloreto de cálcio, respectivamente. Mesmo assim, a adição de 10% de MgCl_2 mostrou-se eficaz no sentido de impedir a gelificação durante o congelamento, enquanto o efeito do CaCl_2 foi oposto, isto é, a amostra sofreu gelificação antes mesmo do congelamento (Figuras 4.26 e 4.29). Da mesma forma, observa-se que, embora a adição de 10% de NaCl ou 10% de sacarose sejam efetivos como inibidores da gelificação (Figuras 4.10 e 4.14), o teor de água não-congelada em cada uma das amostras correspondentes é completamente distinto.

Tabela 4.8 - Valores de entalpia e fração de água congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ para gema com aditivos.

ADITIVO	CONCENTRAÇÃO (% em peso)	%UBU	H_p (kcal/kg) (Experimental)	n_p (% de água congelada)
NaCl	2	46,52	$30,42 \pm 0,49$	$54,41 \pm 1,33$
NaCl	10	43,05	$06,42 \pm 0,63$	$6,04 \pm 0,67$
Sacarose	2	46,87	$34,63 \pm 0,48$	$62,13 \pm 1,30$
Sacarose	10	44,04	$30,30 \pm 0,97$	$57,39 \pm 0,98$
Glicerol	2	46,69	$31,91 \pm 0,81$	$55,82 \pm 2,19$
Glicerol	10	44,41	$27,52 \pm 0,53$	$51,55 \pm 1,51$
MgCl_2	2	47,99	$37,57 \pm 0,81$	$68,09 \pm 2,14$
MgCl_2	10	47,28	$27,52 \pm 0,57$	$48,42 \pm 1,52$
KCl	2	47,36	$33,42 \pm 1,26$	$60,02 \pm 3,36$
KCl	10	43,46	$20,35 \pm 0,69$	$34,69 \pm 1,99$
CaCl_2	2	46,94	$35,12 \pm 0,42$	$64,07 \pm 1,12$
CaCl_2	10	44,98	$24,21 \pm 1,94$	$43,94 \pm 3,80$

4.5. Microscopia Óptica

A microestrutura da gema de ovo já foi descrita em detalhes por diversos autores e uma síntese das principais informações disponíveis na literatura é apresentada no item 2.1.1 deste trabalho.

A gema pode ser considerada como uma emulsão contendo diversas partículas dispersas em uma solução proteica (plasma). Para que seja possível a observação detalhada e a identificação de tais partículas, é necessário o emprego de um microscópio eletrônico. Contudo, a microscopia óptica permite distinguir, com rapidez e facilidade, as alterações provocadas pela presença dos aditivos testados neste trabalho sobre a microestrutura do material.

Foram analisadas amostras contendo 2 e 10% em peso de cada um dos sais testados (NaCl, KCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$), de sacarose e de glicerol, sem congelamento e após permanecerem por 36 horas a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$. As Figuras 4.77 a 4.90 apresentam as micrografias obtidas para a gema pura, com NaCl, sacarose e $MgCl_2$.

Embora sejam claras as diferenças entre amostras contendo diferentes aditivos, não é possível distinguir os efeitos do congelamento. Entretanto, pode-se colher indicações a respeito do mecanismo de ação de cada substância adicionada à gema.

A gema pura é composta de grânulos e gotas de lipídios (esferas) de diâmetros diversos e, após o congelamento não ocorrem alterações detectáveis pelo microscópio óptico, como mostram as Figuras 4.77 e 4.78.

A adição de 2% de NaCl altera profundamente a estrutura original, desestabilizando as gotas de lipídios, que perdem sua forma globular (Figuras 4.79 e 4.80). Também os grânulos parecem solubilizar-se. O aumento da concentração de cloreto de sódio para 10%, por sua vez, causa a total destruição dos grânulos e faz com que os lipídios distribuam-se de forma heterogênea (Figura 4.81 e 4.82).

Essas observações estão de acordo com os resultados de CHANG et alii (1977), que utilizaram concentrações de NaCl semelhante às do presente trabalho.

Esses autores argumentam que a gelificação seria causada pelas altas concentrações salinas atingidas durante o congelamento, decorrentes da transformação parcial da água em gelo. Porém, observa-se que o cloreto de sódio ao nível de 10% é capaz de evitar a gelificação, embora com aumento da viscosidade, contradizendo essa conclusão. Na realidade, as alterações estruturais sofridas pela gema após a adição de NaCl não causam gelificação, e sim, devem servir de base para explicar a diminuição de tal fenômeno.

HASIAK et alii (1972) também estudaram o efeito do cloreto de sódio sobre a microestrutura da fração de alta densidade da gema, obtida por centrifugação a alta velocidade. Utilizando microscopia de transmissão eletrônica, observaram que a adição de 10% de NaCl causa total ruptura nos grânulos e que a aparência das amostras após o congelamento a -26 °C por 72 horas é muito semelhante à da amostra não-congelada. Baseados nesse resultado, os autores supõem que a destruição dos grânulos impediria novas alterações durante o congelamento, evitando a gelificação. Entretanto, não fazem nenhuma menção ao acentuado aumento na viscosidade do material após a adição do sal.

O tratamento da gema com sacarose não provoca alterações estruturais tão drásticas quanto o tratamento com NaCl. O aspecto da amostra contendo 2% desse aditivo (Figura 4.83) é comparável ao da gema pura, ocorrendo apenas uma leve aglomeração dos grânulos, mas sem a liberação de lipídios. Após o congelamento, esses aglomerados aparecem com menor destaque (Figura 4.84), fazendo supor que uma parte dos mesmos foi destruída ou passou a fazer parte de uma estrutura reticular, ao invés de permanecer na forma granular.

O elevação do teor de sacarose para 10% não causou alterações detectáveis na aparência da amostra, mantendo-a muito próxima à da gema pura antes e depois do congelamento (Figuras 4.85 e 4.86). Essas observações são compatíveis com os resultados dos ensaios reológicos, que demonstram a capacidade da sacarose em preservar as propriedades do material. Seu efeito crio-protetor é maior à medida que sua concentração aumenta de 2 para 10%.

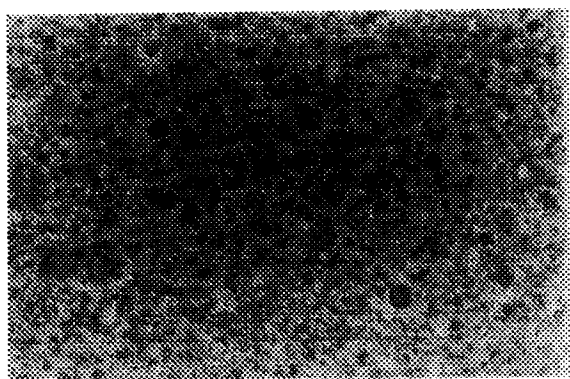


Figura 4.77 - Micrografia da gema pura sem congelar.

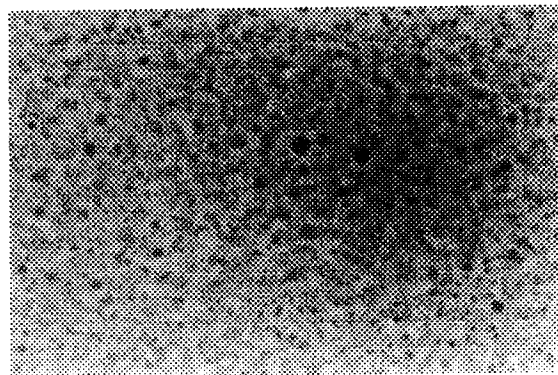


Figura 4.78 - Micrografia da gema pura congelada/descongelada.

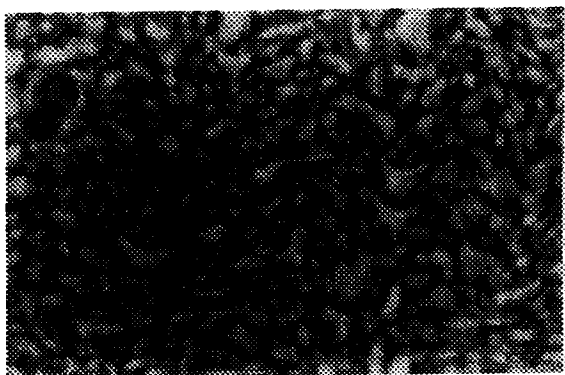


Figura 4.79 - Micrografia da gema com 2% de NaCl sem congelar.

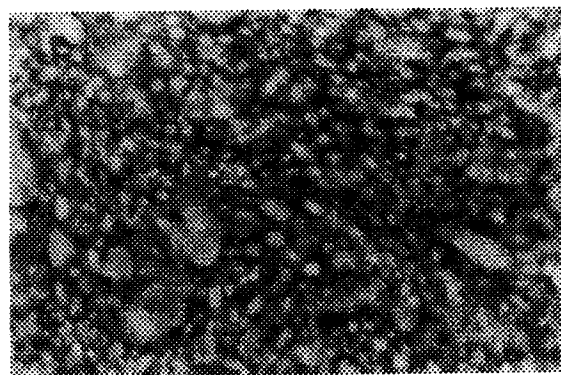


Figura 4.80 - Micrografia da gema com 2% de NaCl congelada/descongelada.

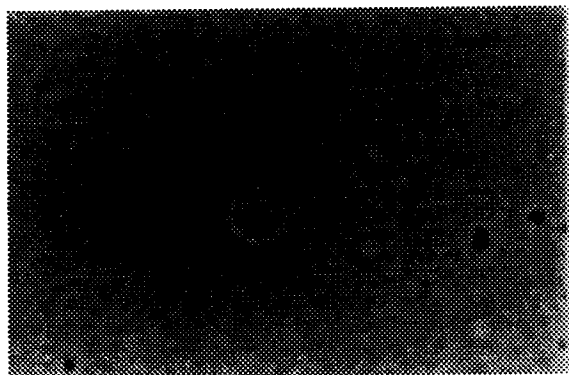


Figura 4.81 - Micrografia da gema com 10% de NaCl sem congelar.



Figura 4.82 - Micrografia da gema com 10% de NaCl congelada/descongelada.

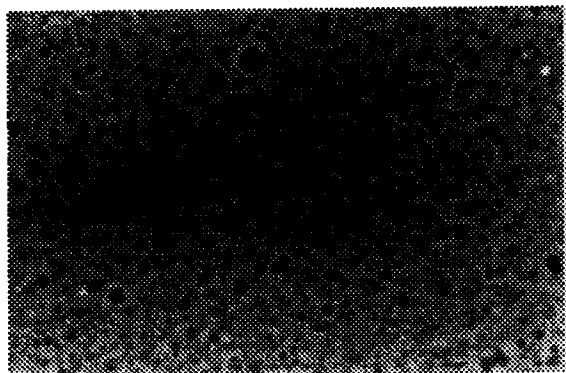


Figura 4.83 - Micrografia da gema com 2% de sacarose sem congelar.

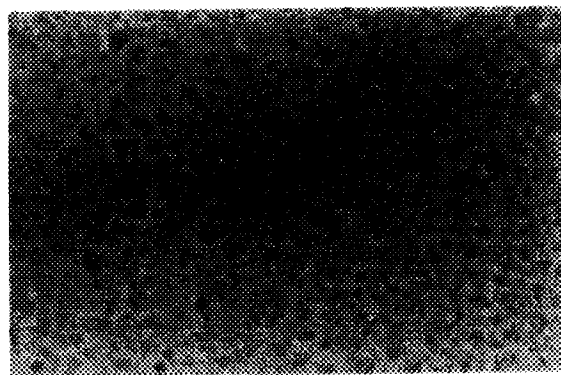


Figura 4.84 - Micrografia da gema com 2% de sacarose congelada/descongelada.

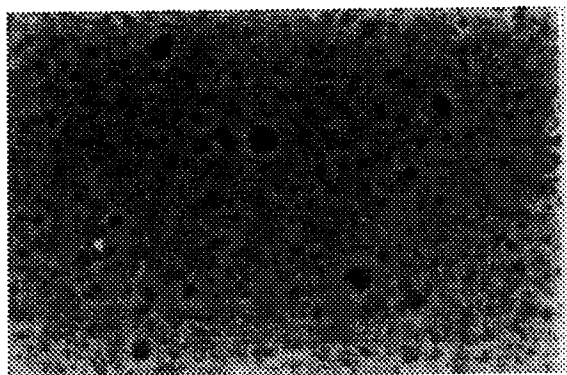


Figura 4.85 - Micrografia da gema com 10% de sacarose sem congelar.



Figura 4.86 - Micrografia da gema com 10% de sacarose congelada/descongelada.

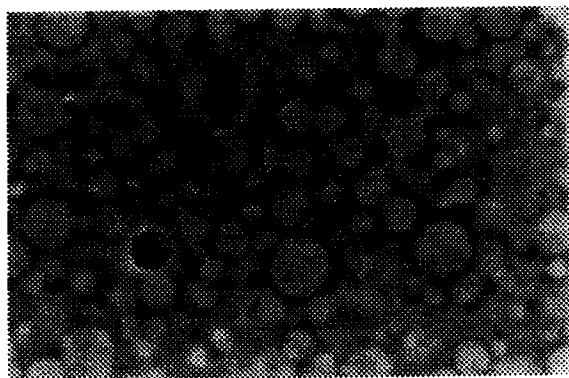


Figura 4.87 - Micrografia da gema com 2% de $MgCl_2$ sem congelar

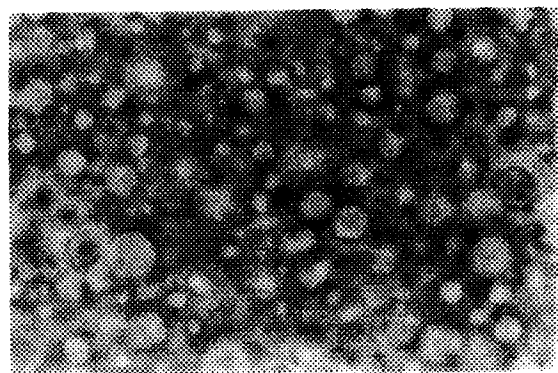


Figura 4.88 - Micrografia da gema com 2% de $MgCl_2$ congelada/descongelada.

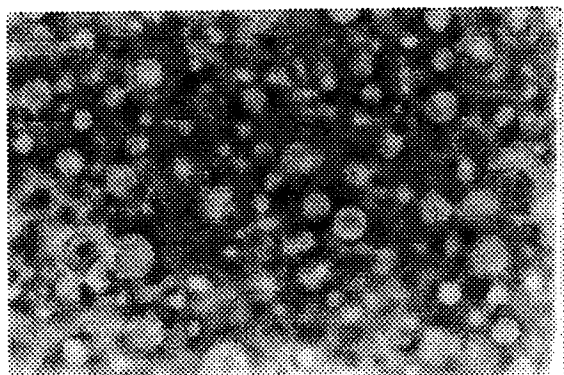


Figura 4.89 - Micrografia da gema com 10% de MgCl_2 sem congelar.

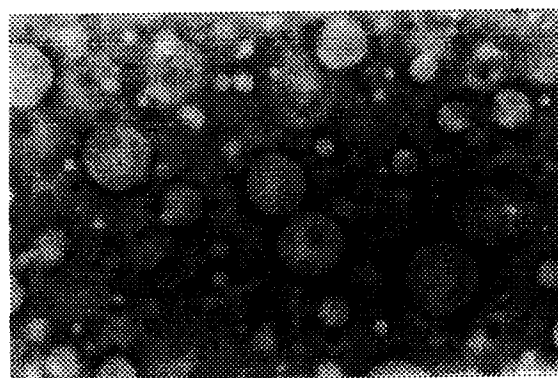


Figura 4.90 - Micrografia da gema com 10% de MgCl_2 congelada/descongelada.

O cloreto de magnésio ao nível de 2%, como mostra a Figura 4.87, desestabiliza completamente o arranjo original dos componentes da gema. A fase lipídica separa-se na forma de glóbulos de diferentes diâmetros imersos em um ambiente não granular. Após o congelamento, é visível a redução do diâmetro médio desses glóbulos e eles aparecem como que aprisionados em uma matriz mais densa, indicando que a fase proteica sofreu rearranjos estruturais (Figura 4.88).

Quando empregado na concentração de 10%, o $MgCl_2$ favoreceu ainda mais a separação dos lipídios, causando o agrupamento das gotas menores em glóbulos de maior diâmetro (Figura 4.89). O congelamento, assim como no caso da concentração de 2%, provocou a diminuição do tamanho das gotas lipídicas, porém, o aspecto da amostra (Figura 4.90) é mais parecido ao da amostra com 2% de $MgCl_2$ sem congelar. A fase lipídica parece estar livre da matriz proteica, uma vez que os glóbulos aparecem em vários planos de foco, e não aprisionada como no caso da Figura 4.88.

De acordo com os resultados dos testes reológicos, o cloreto de magnésio evita a gelificação quando empregado em concentrações superiores a 2%. Uma possível explicação para esse fato seria a capacidade desse sal de destruir o filme composto de proteínas e fosfolipídios responsável pela estabilização dos lipídios presentes na gema na forma de micelas de diâmetro muito pequeno, num efeito semelhante ao relatado por BARBUT & MITTAL (1988) e GORDON & BARBUT (1990) em relação a emulsões de carne de frango, onde a presença do cloreto de magnésio provoca a “quebra” da emulsão.

A presença de grandes glóbulos de lipídios livres na matriz proteica poderia causar um efeito lubrificante e impedir a gelificação ou o simples aumento da viscosidade do material.

É interessante observar que a aparência das amostras contendo 2% de NaCl (Figuras 4.79 e 4.80) é diferente daquelas que contêm 2% de $MgCl_2$. Nas primeiras, a fase lipídica não está completamente livre e, inclusive, verifica-se que as gotas são distorcidas, o que indica que existe uma estrutura reticular exercendo pressão sobre as

mesmas. Essa poderia ser a causa do aumento de viscosidade observado na gema após a adição de NaCl, mesmo antes do congelamento.

A maioria dos trabalhos publicados sobre a microestrutura da gema de ovo concentra-se na análise do material puro ou com adição de NaCl. Não foram encontrados trabalhos sobre o efeito da sacarose ou do MgCl_2 que permitissem a comparação dos resultados obtidos.

5. CONCLUSÕES

O estudo das alterações estruturais da gema de ovo através de medidas reológicas dinâmicas, calorimetria e microscopia óptica permitiu que se chegasse às seguintes conclusões:

- Para que ocorra a gelificação é necessária a formação de gelo, uma vez que amostras super-resfriadas a -10 e -12 °C por aproximadamente 24 horas não sofreram alterações em seus parâmetros reológicos.
- Havendo a formação de gelo, o grau de gelificação aumenta em função da diminuição da temperatura de estocagem na faixa de -10 a -24 °C. A partir desse ponto, à medida que a temperatura é reduzida, menores são as alterações sofridas pelas propriedades reológicas da gema.
- O emprego do congelamento rápido, com nitrogênio líquido, evita a gelificação, desde que a estocagem seja feita em temperaturas inferiores a -24 °C.
- A gelificação é um fenômeno dependente do tempo e ocorre mais rapidamente à medida em que a temperatura de estocagem é reduzida na faixa de -10 a -14 °C. Para temperaturas de estocagem situadas no intervalo de -14 a -24 °C, não existem diferenças significativas na velocidade de gelificação.
- A cinética de gelificação em função da temperatura de estocagem de amostras submetidas à crio-estruturação e depois armazenadas em temperaturas na faixa de -14 a $-37,5$ °C, pode ser descrita por uma equação do tipo Arrhenius, com energia de ativação de 16,6 kcal/mol.
- O gel formado durante o congelamento pode ser classificado como um gel físico, sem ligações covalentes e com estrutura heterogênea, sendo provavelmente constituído de agregados das partículas sólidas componentes da gema.

- A adição de NaCl à gema é capaz de evitar a gelificação em concentrações maiores que 2% em peso. Contudo, quando utilizado no nível de 10% em peso, esse sal é responsável por um aumento acentuado no módulo de dissipação da gema sem congelar, o que também é prejudicial ao produto. Para evitar a gelificação sem provocar o aumento do módulo de dissipação, recomenda-se o emprego de cloreto de sódio em concentrações na faixa de 4 a 8%.
- Entre os aditivos testados, a sacarose demonstrou um ótimo efeito crio-protetor. Mesmo sendo utilizada na concentração de apenas 2% em peso, essa substância foi capaz de impedir a gelificação após 26 horas de estocagem a -24 °C. O efeito crio-protetor é maior à medida que a concentração aumenta até 8%. Entre 8 e 10% em peso não existem diferenças significativas. Após o congelamento, a gema aditivada com sacarose apresenta comportamento típico de um fluido viscoelástico.
- A adição de glicerol à gema também foi bastante satisfatório sob o ponto de vista de evitar a gelificação. Seu efeito é praticamente o mesmo que o observado com a sacarose.
- O cloreto de magnésio mostrou-se capaz de evitar a gelificação quando empregado em concentrações superiores a 2% em peso. Para concentrações de $MgCl_2$ na faixa de 4 a 10% em peso, os módulos de armazenamento e dissipação permanecem praticamente constantes durante o congelamento.
- A adição de KCl à gema na faixa de concentrações de 2 a 10% em peso tem efeitos equivalentes ao do cloreto de sódio antes do congelamento. Entretanto, durante o congelamento o cloreto de potássio parece potencializar o processo de gelificação, uma vez que a gema com 2% de KCl congelada a -24 °C por 36 horas apresentou um comportamento altamente elástico.
- O cloreto de cálcio pode ser considerado como um agente indutor da gelificação. Sua ação como agente de coagulação pode ser observada antes mesmo do congelamento. As amostras contendo 2% em peso de cloreto de cálcio

apresentaram-se completamente gelificadas após o congelamento a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 36 horas.

- Existem fortes indícios de que a temperatura de transição vítrea da matriz maximamente concentrada da gema de ovo é de cerca de $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entretanto, são necessários mais ensaios calorimétricos para que sejam obtidos resultados conclusivos sobre esse parâmetro.
- A entalpia da gema de ovo pura pode ser estimada adequadamente pela equação de SCHWARTZBERG, na faixa de temperaturas de -5 a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, adotando para o coeficiente b o valor de 0,19.
- Fazendo uso de microscopia óptica, foi possível concluir que a sacarose, bem como o glicerol praticamente não provocam alterações estruturais na gema. A adição de 2% de NaCl provoca a desestabilização da fase lipídica, a qual se concentra em gotas que ficam aprisionadas em meio à matriz proteica. A adição de 10% de NaCl provoca a destruição total dos grânulos presentes inicialmente na gema.
- O cloreto de magnésio provoca a separação dos lipídios, provavelmente pela destruição do filme composto por proteínas e fosfolipídios responsáveis pela sua estabilização. As grandes gotas de lipídios que permanecem livres na matriz podem ser responsáveis por um efeito lubrificante, que impediria o aumento da viscosidade a gelificação.
- O fato de que cada um dos sais testados tenha provocado um efeito distinto, demonstra que sua ação não se dá através do íon cloreto, e sim envolve cada um dos cátions em particular.
- O emprego de medidas reológicas dinâmicas mostrou-se adequado para o estudo das alterações estruturais da gema durante o congelamento. Entretanto, para que seja possível esclarecer o mecanismo pelo qual se dá a gelificação, é essencial o emprego de técnicas que forneçam informações a nível molecular. Além disso, é essencial que se proceda ao fracionamento da gema, permitindo identificar com maior segurança os componentes envolvidos no processo.

- Em relação à calorimetria diferencial de varredura, é importante o emprego de um instrumento de maior sensibilidade, isto é, um microcalorímetro, com maior estabilidade da linha base do termograma e capacidade para detectar alterações de menor intensidade no fluxo de calor, uma vez que as transições envolvidas em sistemas multicomponentes como os materiais alimentícios, envolvem pequenas quantidades de energia.

APÊNDICE A

CÁLCULO DOS TEMPOS DE CONGELAMENTO

Para estimar o tempo de congelamento das amostras em função da temperatura do meio de refrigeração, foi selecionado o método simplificado de PHAM (1986), devido à sua simplicidade e pequeno número de parâmetros envolvidos.

O método consiste na utilização do seguinte conjunto de equações:

$$t = \frac{V}{hA} \left(\frac{\Delta H_1}{\Delta T_1} + \frac{\Delta H_2}{\Delta T_2} \right) \left(1 + \frac{Bi_s}{4} \right) \quad (A.1)$$

onde

$$\Delta H_1 = C_{p_p}(T_0 - T_{cm}) \quad (A.2)$$

$$\Delta H_2 = H_{lat} + C_{p_c}(T_{cm} - T_{fc}) \quad (A.3)$$

$$\Delta T_1 = (T_0 + T_{cm})/2 - T_a \quad (A.4)$$

$$\Delta T_2 = T_{cm} - T_a \quad (A.5)$$

$$T_{cm} = 1,8 + 0,263T_{fc} + 0,105T_a \quad (A.6)$$

Nas equações acima, as variáveis têm os seguintes significados e unidades:

A = área superficial, m^2

Bi_c = número de Biot (hD/k) do produto congelado

C_{p_p} = calor específico volumétrico do produto não-congelado. $J/m^3 K$

C_{p_c} = calor específico volumétrico do produto congelado. $J/m^3 K$

D = comprimento característico, igual a duas vezes o caminho médio da condução.

Para um retângulo, $D = 1,46 (W_1 W_2)^{1/2}$.

h = coeficiente de transferência de calor na superfície, $W/m^2 K$

ΔH_1 e ΔH_2 = variação de entalpia durante o resfriamento e o congelamento, J/m³

k = condutividade térmica do material, W/m K

H_{lat} = calor latente de congelamento volumétrico, J/m³

t = tempo de congelamento, s

T_a , T_{fc} e T_0 = temperatura do meio, do centro térmico final e inicial, °C

T_{cm} = temperatura média de congelamento, °C

ΔT_1 e ΔT_2 = potencial de transferência de calor durante o resfriamento e o congelamento, °C

V = volume do corpo, m³

W_1 e W_2 = dois menores lados do retângulo, m

Para possibilitar a comparação entre os tempos de congelamento em função da temperatura do meio de refrigeração, estes foram calculados para uma variação de temperatura, no centro térmico da amostra, de $T_0 = 25$ °C até $T_{fc} = -10$ °C.

Considerando os dados de temperatura versus tempo de congelamento da gema apresentados na Figura 3.1, para duas temperaturas do meio de refrigeração ($T_a = -12$ e -18 °C), foi estimado o valor do termo constante $(V/hA)(1+Bi_s/4)$ da equação A.1, da seguinte forma:

- para o calor específico da gema congelada e não-congelada foram adotados os valores de RIEDEL (1957), respectivamente $1,76 \times 10^6$ J/m³ K e $3,56 \times 10^6$ J/m³ K;
- o valor do calor latente volumétrico foi estimado a partir dos dados experimentais deste trabalho, segundo a Tabela 4.7, sendo igual a $1,23 \times 10^8$ J/m³ a -10 °C;
- para os dados da Figura 3.1, para cada uma das temperaturas do meio (-12 e -18 °C), foi calculado o termo $X = (\Delta H_1/\Delta T_1 + \Delta H_2/\Delta T_2)$ em função do tempo, t ;
- através de regressão linear de t versus X , foi determinado o valor do termo constante.

O valor encontrado foi $(V/hA)(1+Bi_s/4) = 1,4 \times 10^{-4} \text{ (W/m}^3 \text{ K)}^{-1}$, para as duas temperaturas consideradas.

Essa constante foi, então, utilizada para o cálculo do tempo de congelamento de amostras sob as mesmas condições, sendo alterada apenas a temperatura do meio, T_a . Os resultados são apresentados na Tabela 4.2.

Na Tabela A.1 encontram-se os dados de tempo versus temperatura correspondentes à Figura 3.1.

Tabela A.1 - Temperatura do centro térmico da amostra em função do tempo, para temperatura do meio igual a -12 e -18 °C.

$T_a = -12 \text{ }^\circ\text{C}$		$T_a = -18 \text{ }^\circ\text{C}$	
Tempo (s)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Tempo (s)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)
0	25	0	25
420	-6,7	30	10,6
840	-8,0	180	-1,8
1260	-9,9	360	-7,0
1680	-11,2	540	-9,5
2040	-11,7	720	-13,4
-	-	900	-16,1
-	-	1080	-17,3
-	-	1260	-17,6
-	-	1440	-17,7

APÊNDICE B

TERMOGRAMAS

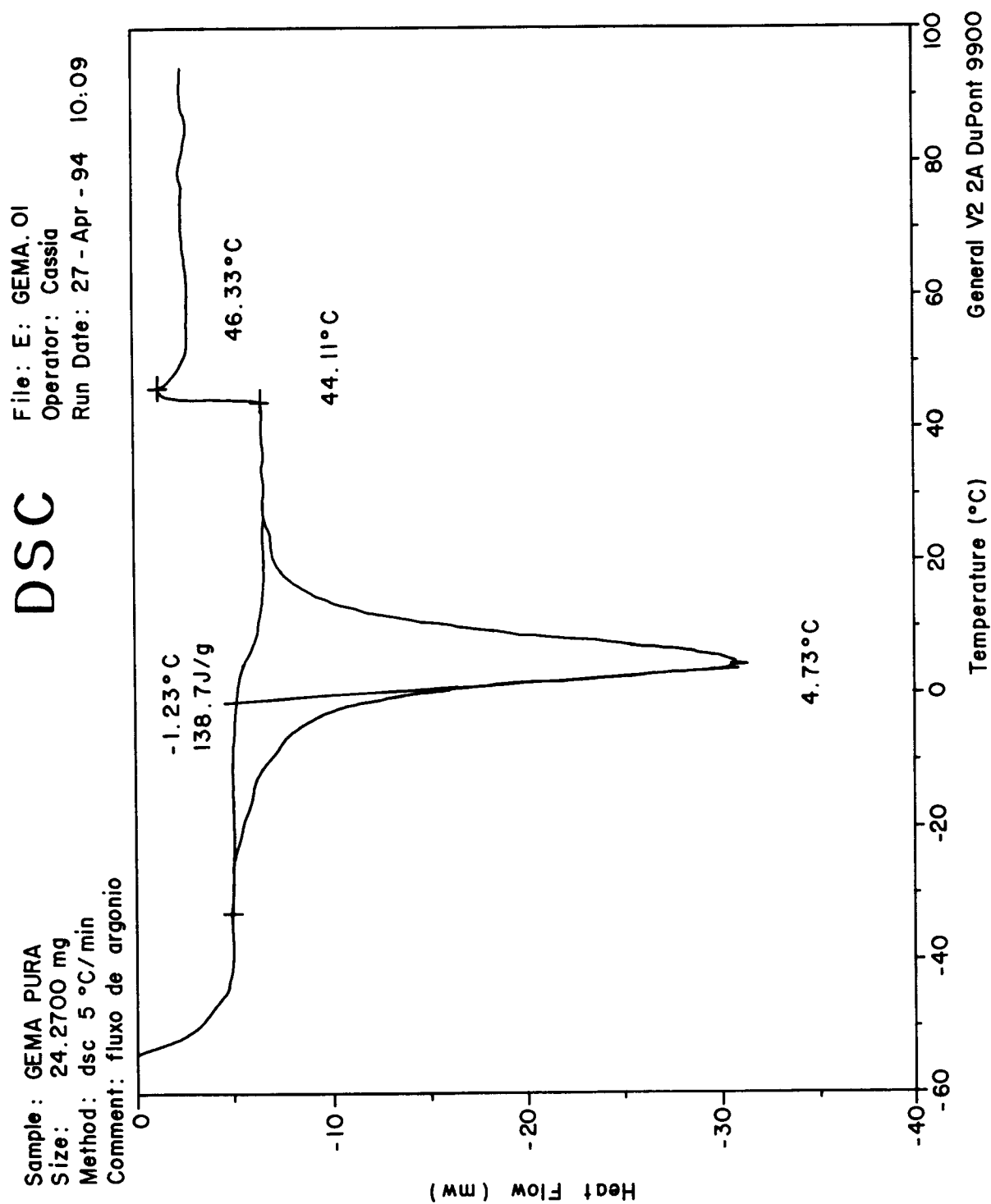


Figura B.1 - Termograma de gema pura em estado nativo.

Sample: gema natural
Size: 20.9600 mg
Method: dsc 5 °C/min
Comment: fluxo de argonio

DSC

File: E: GEMA - NAT.OI
Operator: Cassia
Run Date: 13-May-94 10:31

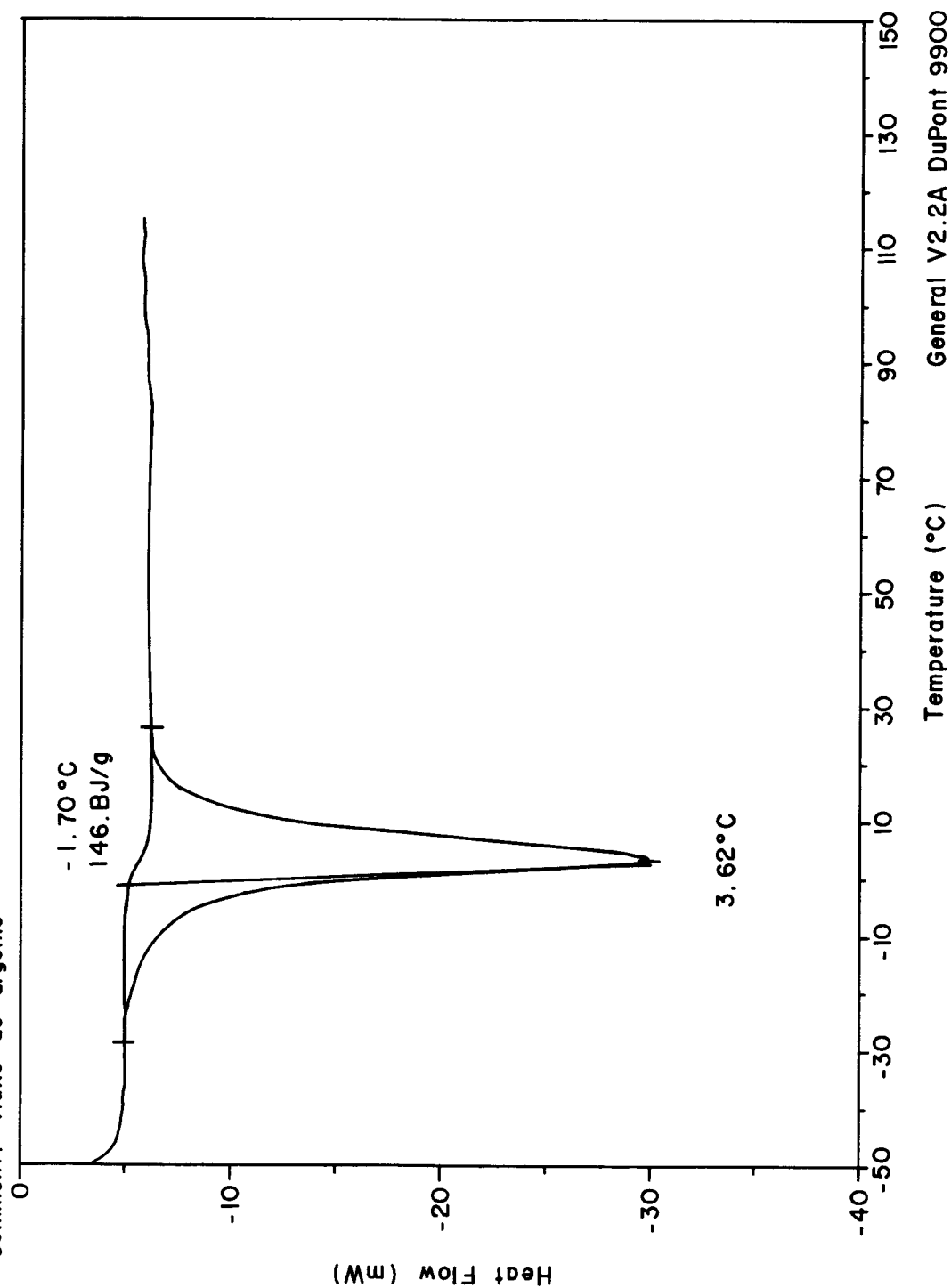


Figura B.2 - Termograma de gema pura em estado nativo (repetição).

DSC

Sample: GEMA PURA
Size: 31.6600 mg
Method: 5°C/min
Comment: fluxo de argonio

File: E: GEMA-PURA.OI
Operator: Renata
Run Date: 22 - Jun - 95 09:51

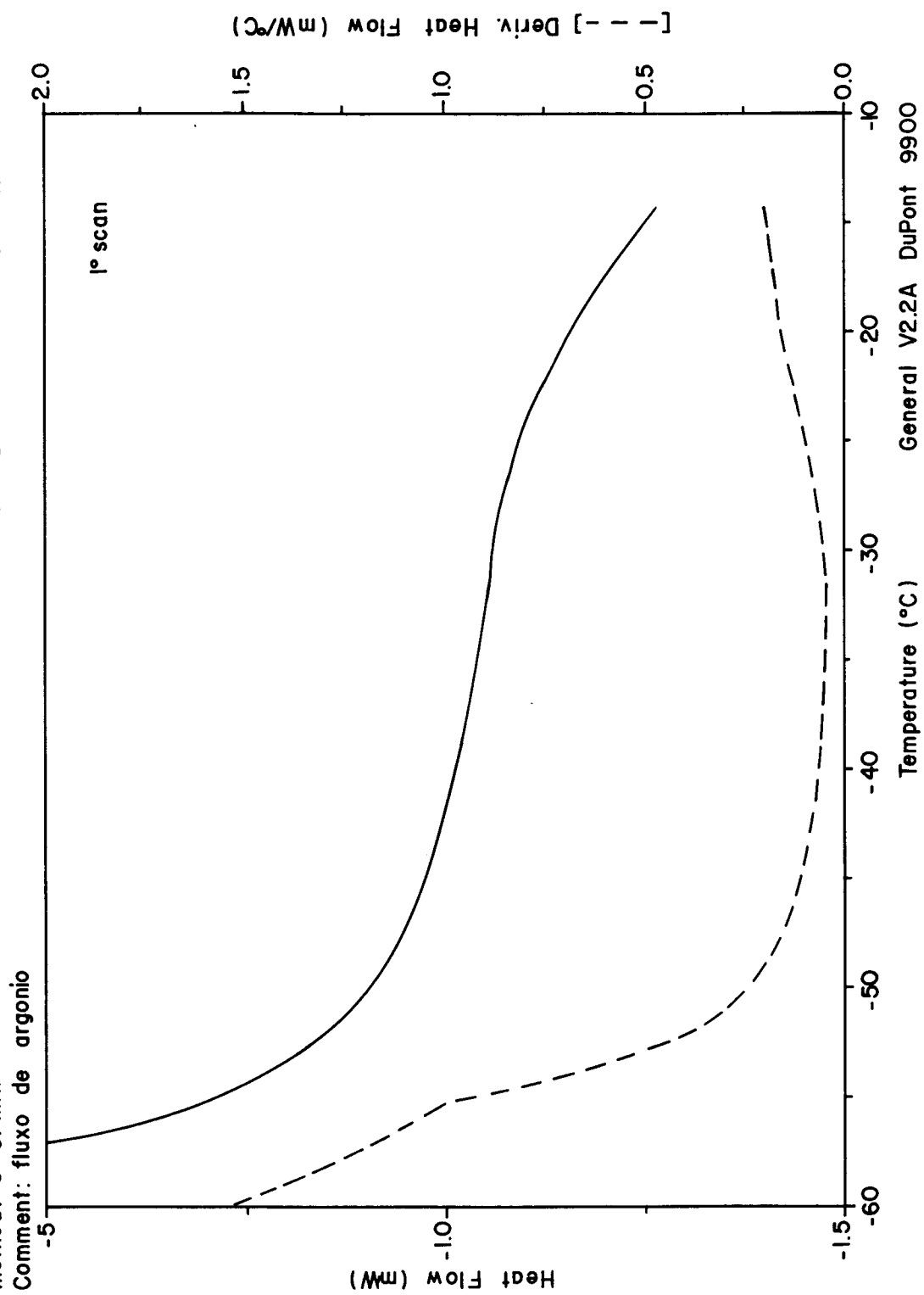


Figura B.3 - Termograma de gema pura em estado nativo (repetição).

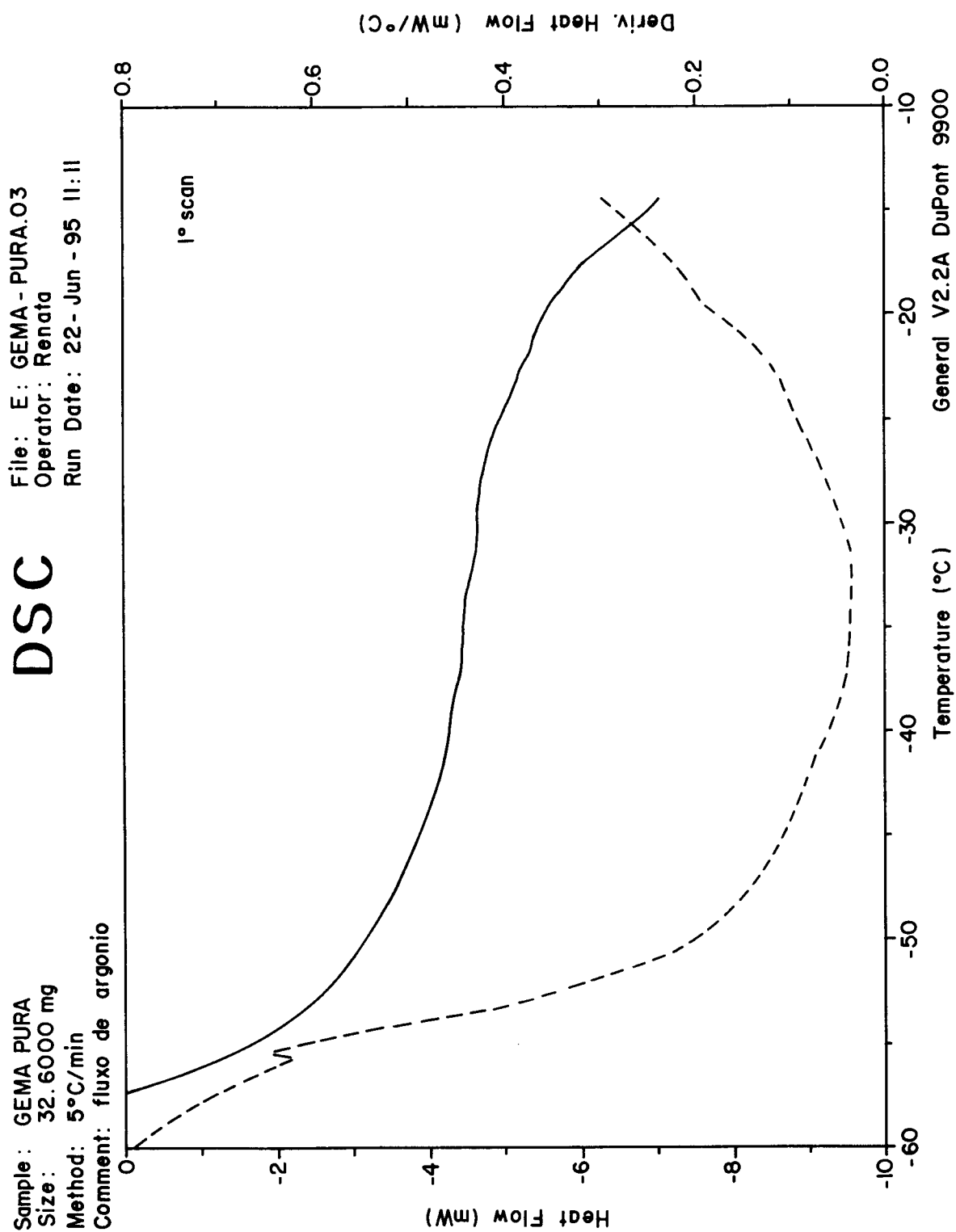


Figura B.4 - Termograma de gema pura em estado nativo (repetição).

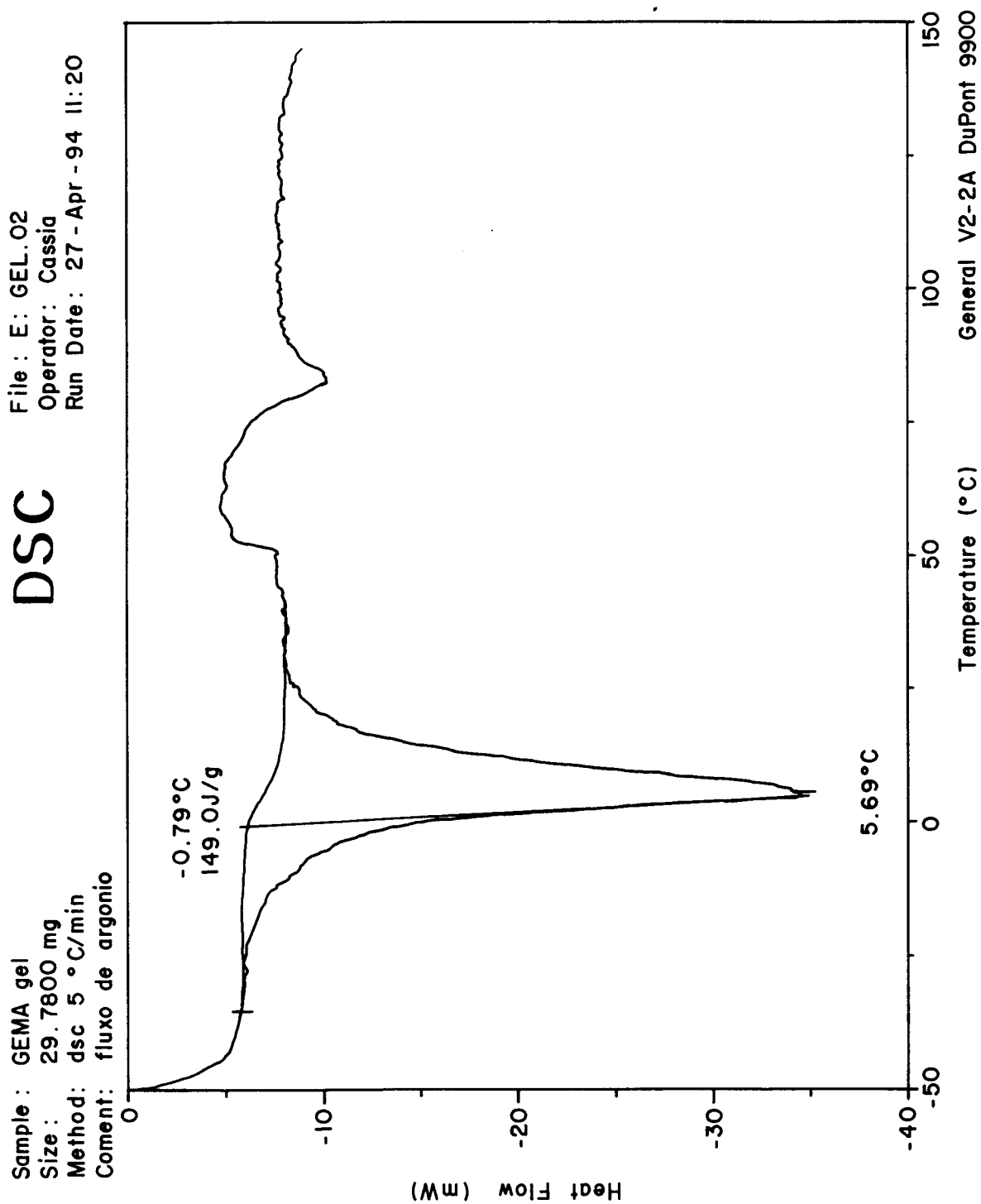


Figura B.5 - Termograma de gema pura congelada a -20 °C por 24 horas e descongelada a 20 °C por 20 minutos.

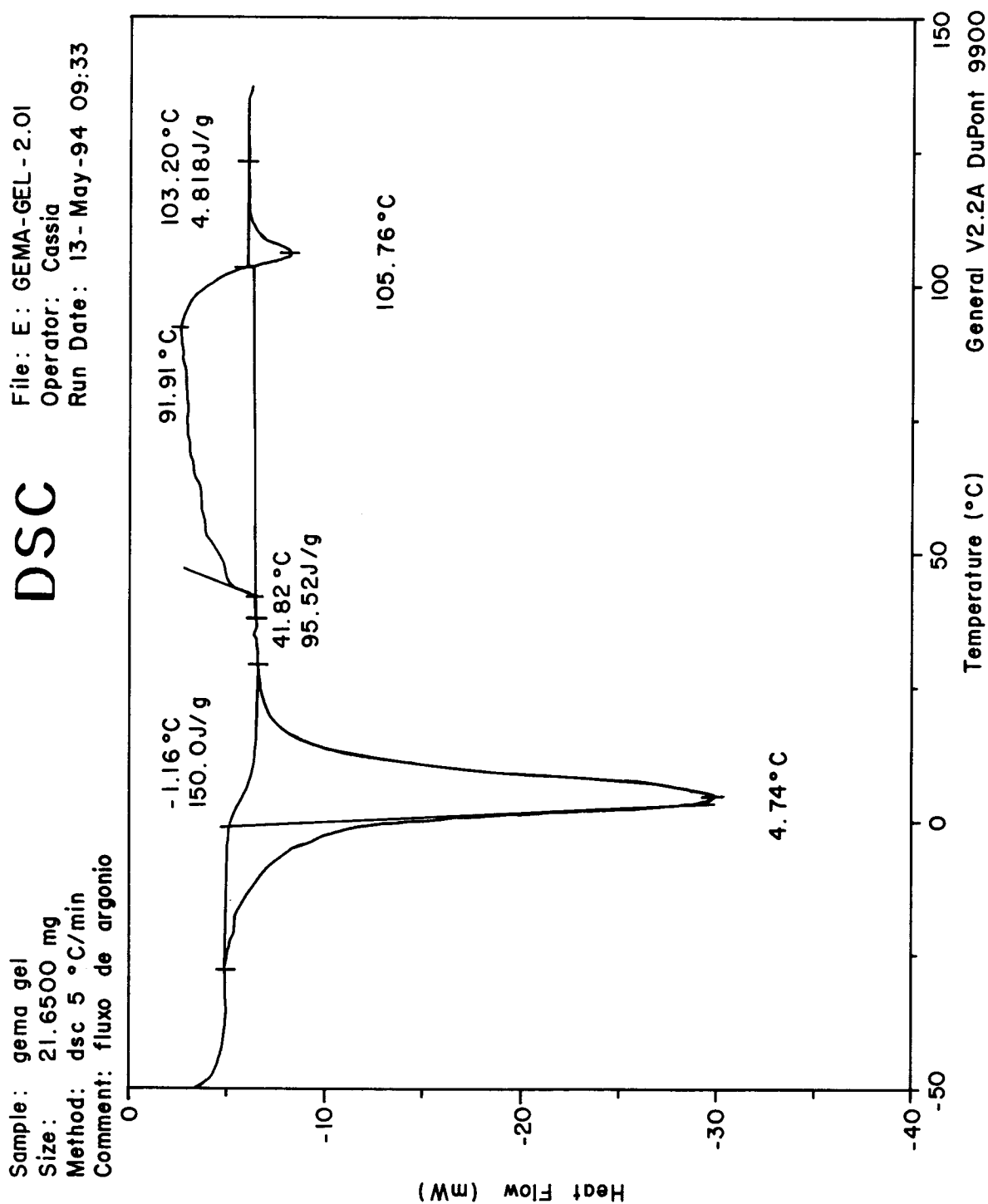


Figura B.6 - Termograma de gema pura congelada a -20 °C por 24 horas e descongelada a 20 °C por 20 minutos (repetição).

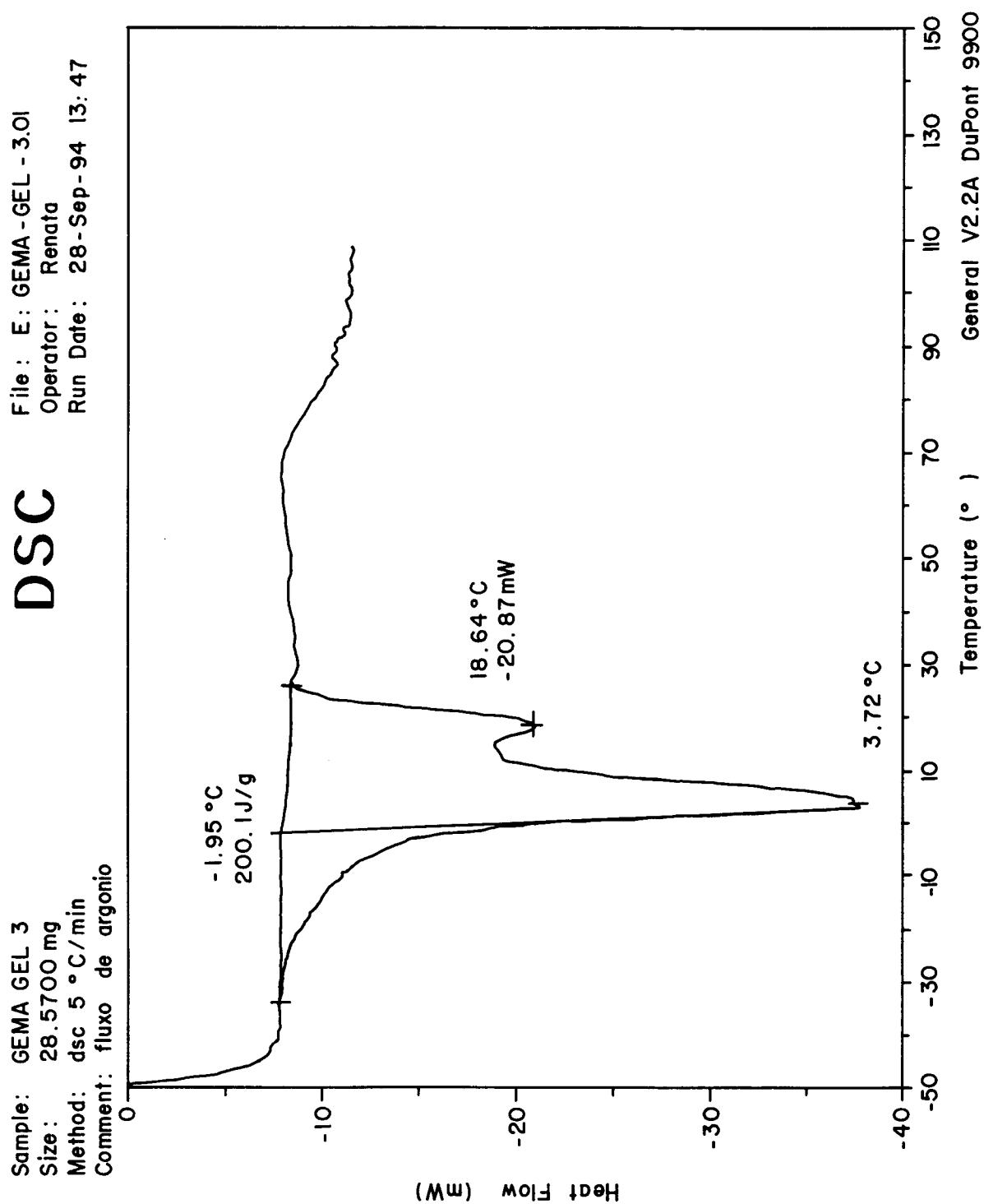


Figura B.7 - Termograma de gema pura congelada a -20 °C por 24 horas e descongelada a 20 °C por 20 minutos (repetição).

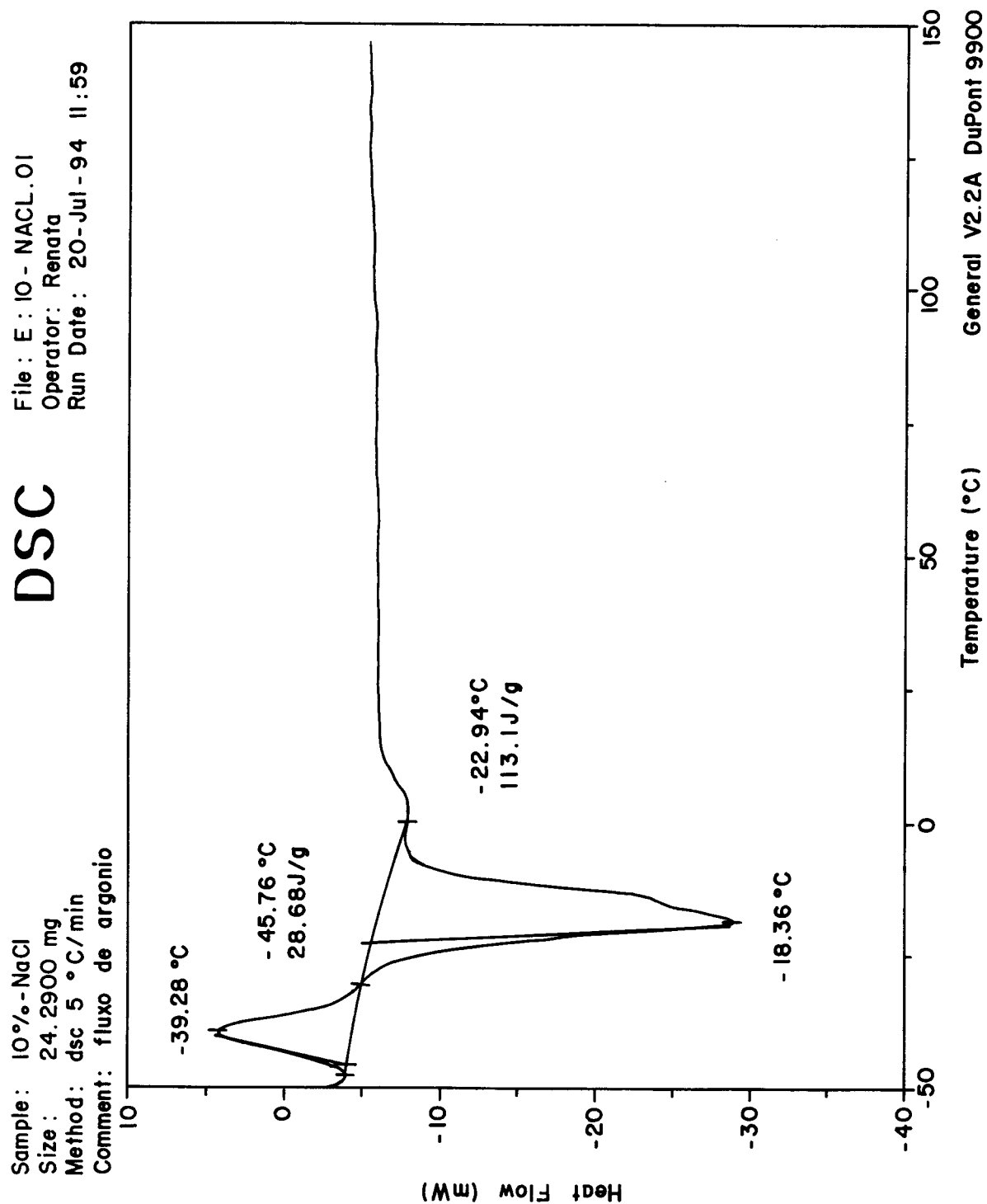


Figura B.8 - Termograma de gema com 10% em peso de NaCl.

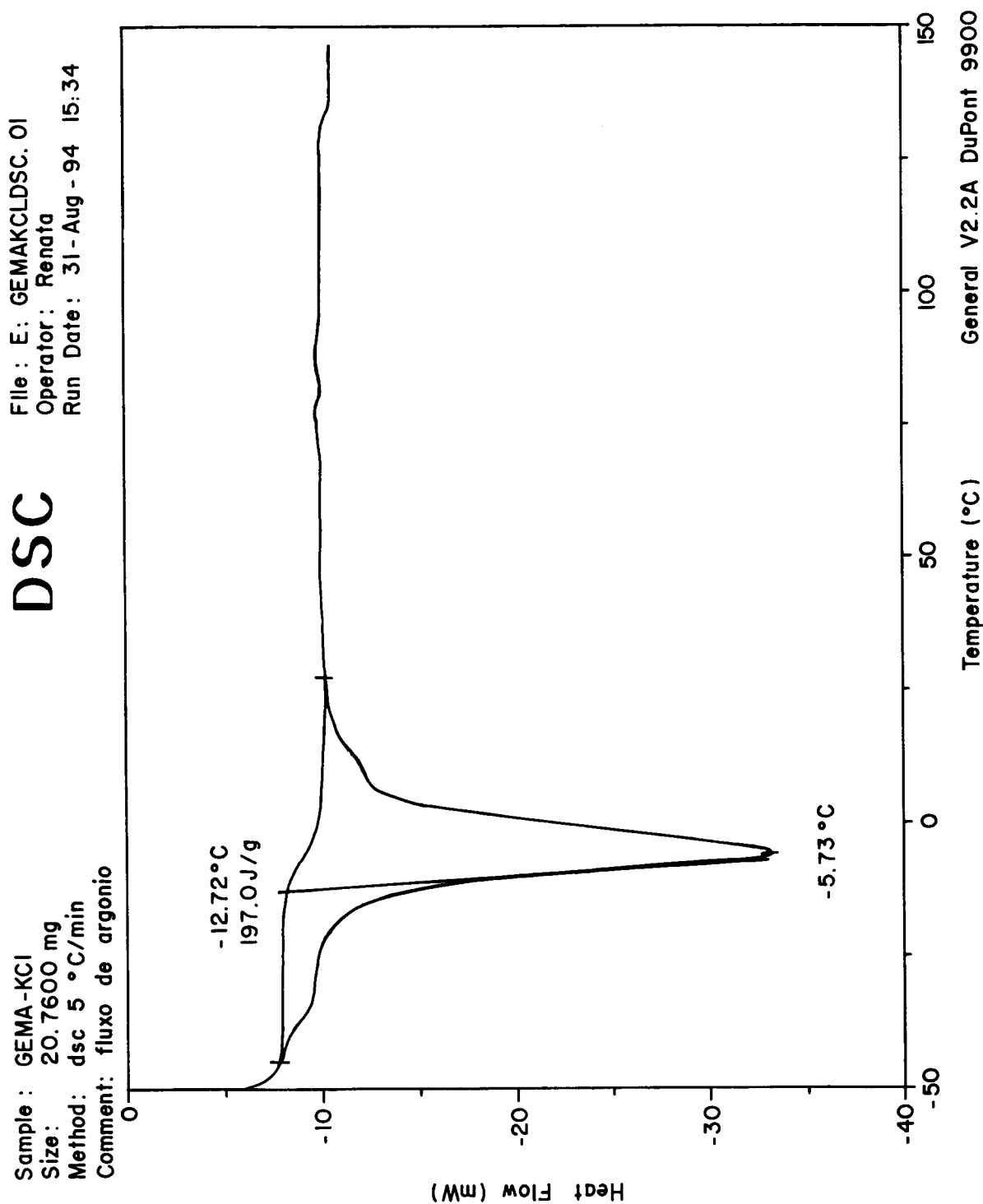


Figura B.9 - Termograma de gema com 10% em peso de KCl.

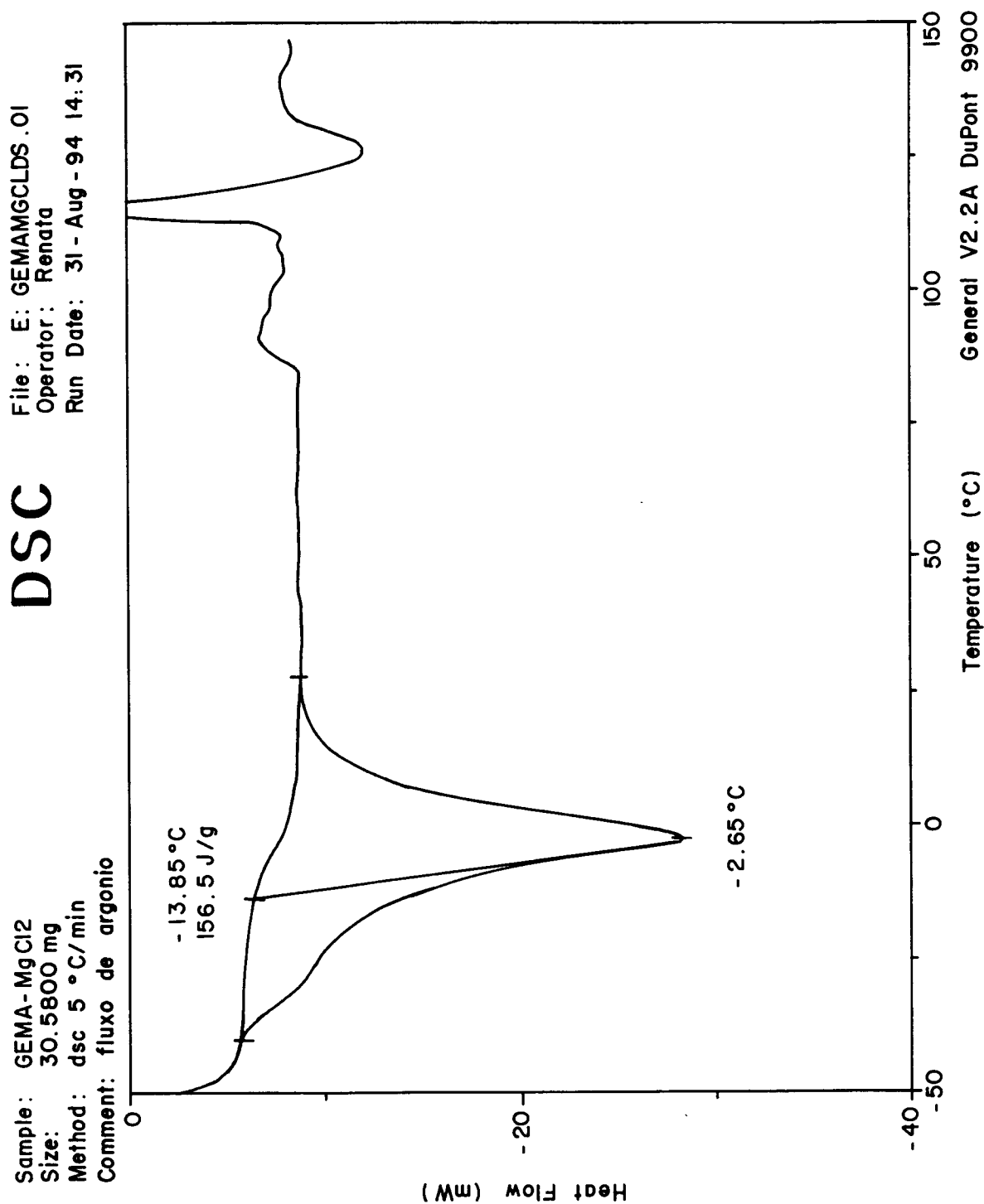


Figura B.10 - Termograma de gema com 10% em peso de MgCl₂.

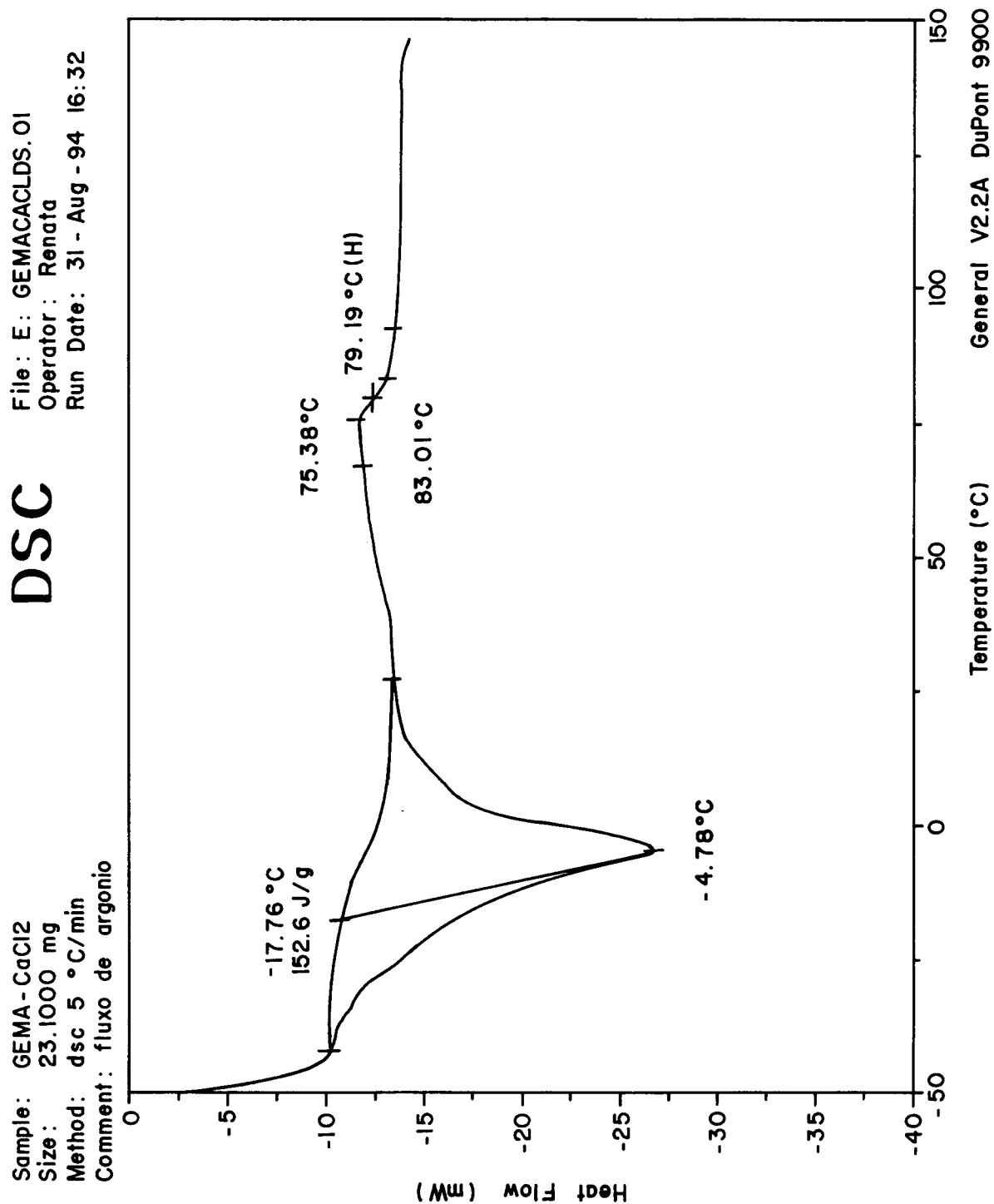


Figura B.11 - Termograma de gema com 10% em peso de CaCl₂.

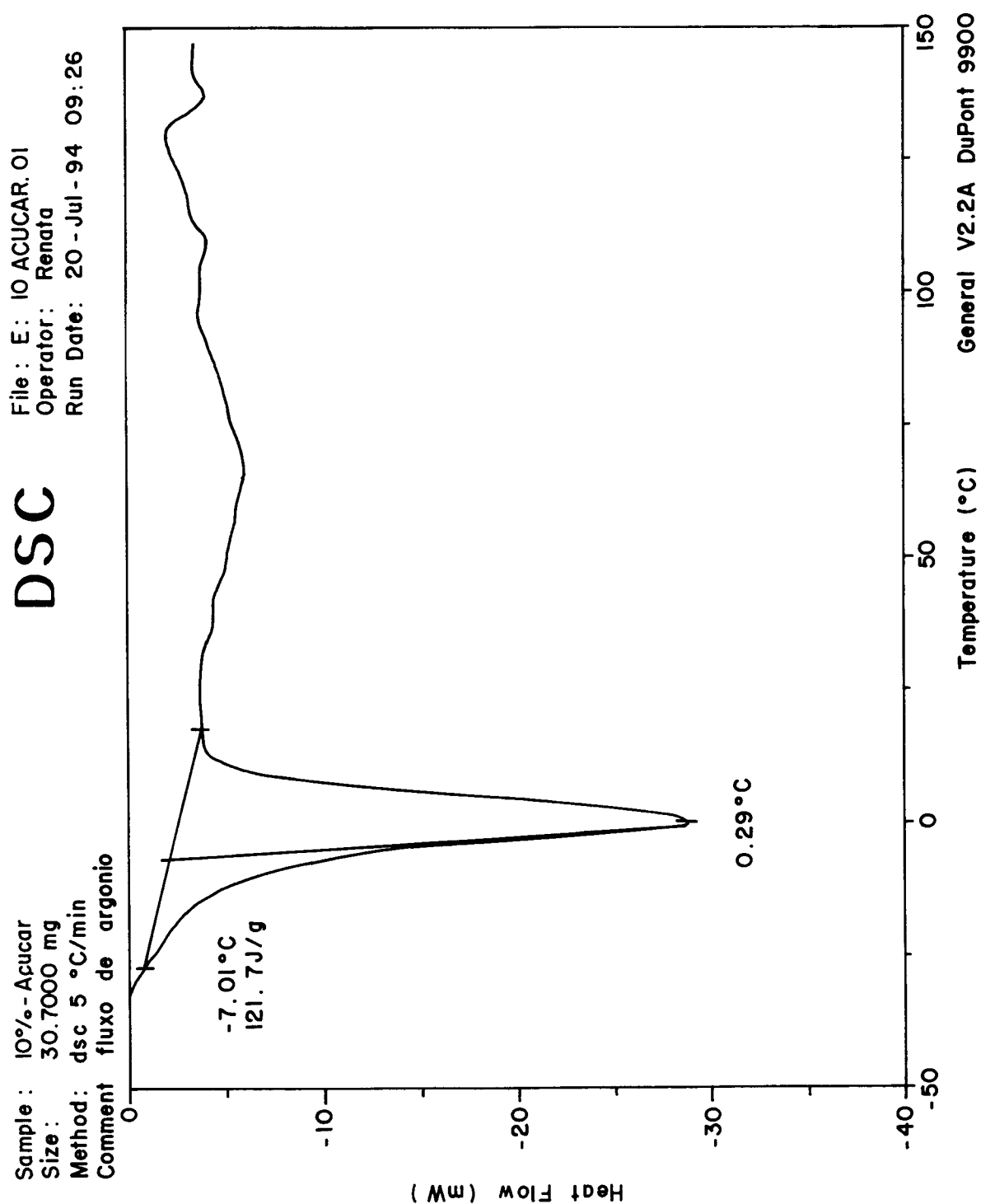


Figura B.12 - Termograma de gema com 10% em peso de Sacarose.

ANEXO A

DADOS DE CALOR ESPECÍFICO E ENTALPIA DE RIEDEL (1957)

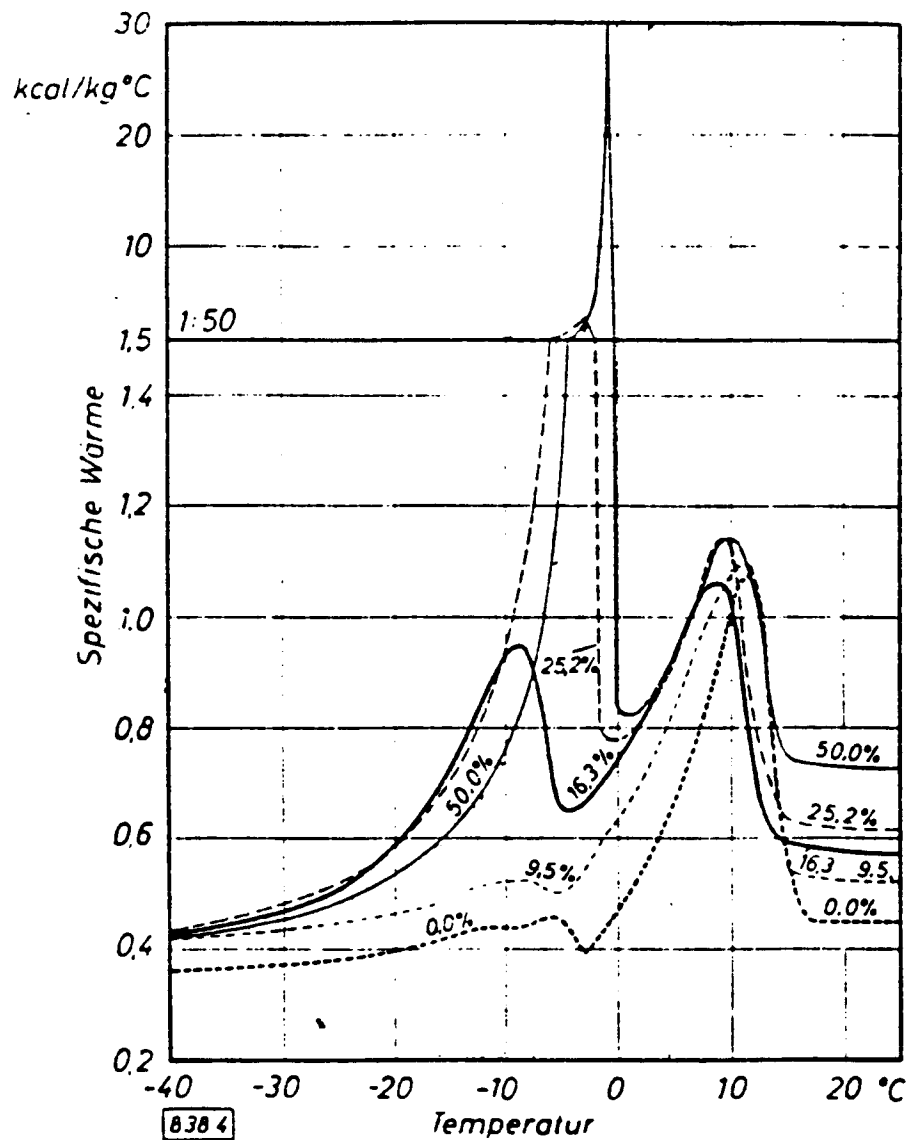


Figura AA.1 - Calor específico em função da temperatura da gema de ovo com vários teores de umidade (RIEDEL, 1957).

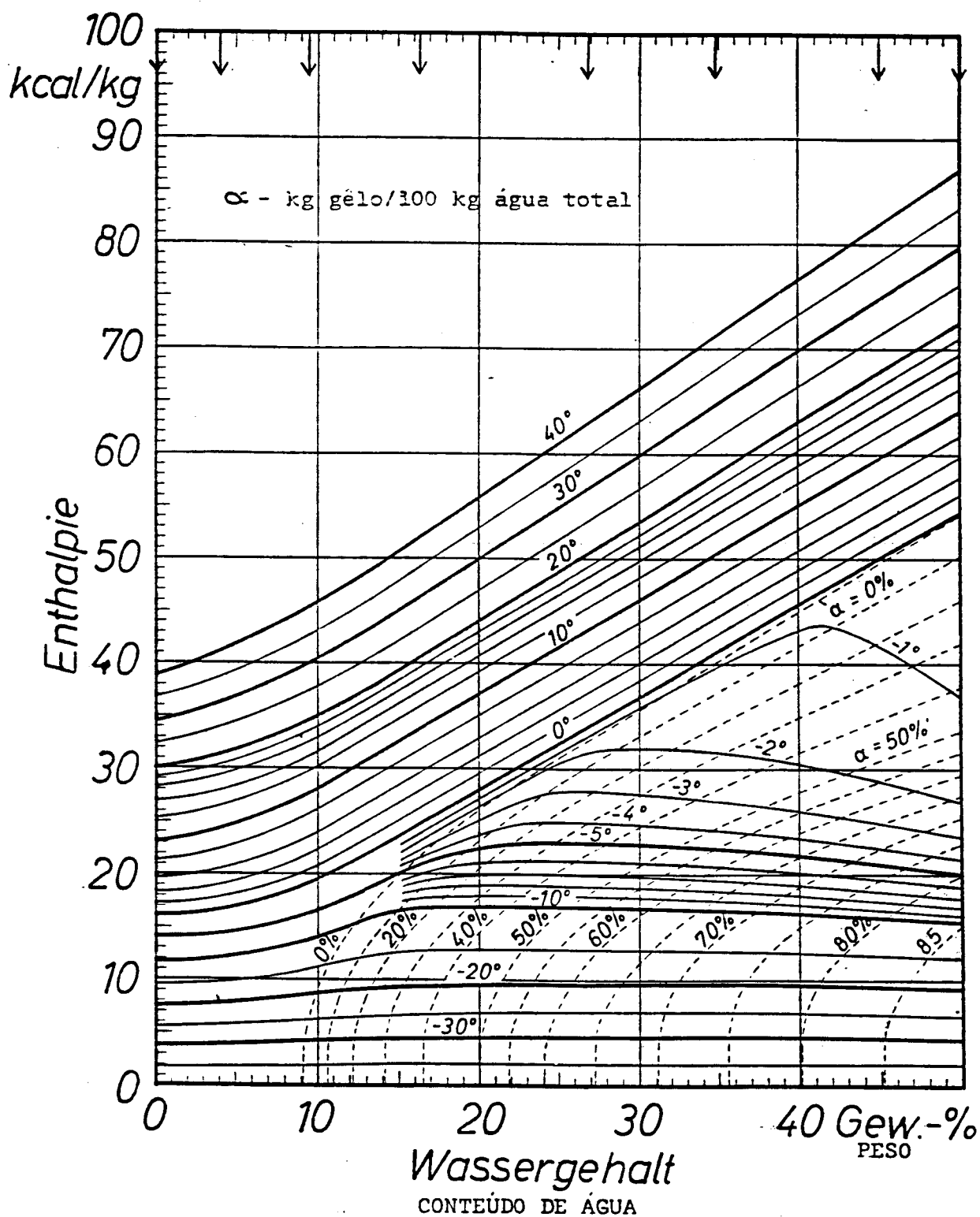


Figura AA.2 - Entalpia e fração de água congelada da gema de ovo em função da temperatura e do teor de umidade (RIEDEL, 1957)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALFREY Jr., T. & GUERNEE, E.F., Dynamics of viscoelastic behaviour, in *Rheology: Theory and Applications*, vol. 1, ed. Eirich, F.R., Academic Press, New York, 387-428, 1956.
2. ANÔNIMO, Relatório da APA - Associação Paulista de Avicultura, 29 págs., jan. 1995.
3. ARAKAWA, T. & TIMASHEFF, S.N., Stabilization of protein structure by sugars, *Biochemistry*, **21**: 6536-6544, 1982a.
4. ARAKAWA, T. & TIMASHEFF, S.N., Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions, *Biochemistry*, **21**: 6545-6552, 1982b.
5. BACK, J.F., OAKENFULL, D. & SMITH, M., Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Biochemistry*, **18**: 5191-5196, 1979.
6. BARBUT, S. & MITTAL, G.S., Rheological and gelation properties of meat batters prepared with three chloride salts, *J. Food Sci.*, **53**(5): 1296-1299, 1311, 1988.
7. BARNES, H.A., HUTTON, J.F. & WALTERS, K., *An Introduction to Rheology*, Elsevier, 37-54, 1989.
8. BEVILACQUA, A.E. & ZARITZKY, N.E., Ice morphology in frozen beef, *J. Food Technol.*, **15**: 589-597, 1980.
9. BEZRUKOV, M.G., Spatial structure formation in protein gels, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **18**: 599-610, 1979.
10. BURLEY, R.W. & COOK, W.H., Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituents α - and β -lipovitellins, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**: 1295-1307, 1961.
11. BURLEY, R.W., Recent advances in the chemistry of egg yolk, *CSIRO. Food Res.*, **35**: 1-5, 1975.
12. CARPENTER, J.F. & CROWE, J.H., The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes, *Cryobiology*, **25**(3): 244-255, 1988.
13. CAUSERET, D., MATRINGE, E. & LORIENT, D., Ionic strength and pH effects on composition and microstructure of yolk granules, *J. Food Sci.*, **56**(6): 1532-1535, 1991.
14. CHANG, C.H., POWRIE, W.D. & FENNEMA, O., Studies on the gelation of egg yolk and plasma upon freezing and thawing, *J. Food Sci.*, **42**(6): 1658-1665, 1977.

15. COOK, W.H. & MARTIN, W.G., Composition and properties of soluble lipoproteins in relation to structure, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**: 1273-1285, 1962.
16. CROWE, J.H., CARPENTER, J.F., CROWE, L.M. & ANCHORDOGUY, T.J., Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules, *Cryobiology*, **27**(3): 219-231, 1990.
17. DICKSON, I.R. & PERKINS, D.J., Studies on the interactions between purified bovine caseins and alkaline-earth-metal ions, *Biochem. J.*, **124**: 235-240, 1971.
18. EGELANDSDAL, B., FRETHEIM, K. & HARBITZ, O., Dynamic rheological measurements on heat-induced myosin gels: an evaluation of the method's suitability for filamentous gels, *J. Food Sci. Agric.*, **37**: 944-954, 1986.
19. FRANKS, F., ASQUITH, M., HAMMOND, C., SKAER, H.B. & ECHLIN, P., Polymeric cryoprotectants in the preservation of biological ultrastructure, *J. Microscopy*, **110**(3): 223-238, 1977.
20. FERRY, J.D., *Viscoelastic Properties of Polymers*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, 641 págs., 1980.
21. FLORY, P.J., Introductory Lecture, *Discuss. Faraday, Soc.*, 7-18, 1974
22. GARLAND, T.D. & POWRIE, W.D., Chemical characterization of egg yolk myelin figures and low-density lipoproteins isolated from egg yolk granules, *J. Food. Sci.*, **43**: 1210-1214, 1978.
23. GORDON, A. & BARBUT, S., The microstructure of raw meat batters prepared with monovalent and divalent chloride salts, *Food Structure*, **9**: 279-295, 1990.
24. GRAESSLEY, W.W., Viscoelasticity and flow in polymer melts and concentrated solutions, in *Physical Properties of Polymers*, ed. Mark, J.E., Eisenberg, A., Graessley, W.W., Madelkern, L. & Koenig, J.L., American Chemical Society, Washington D.C., 97-153, 1984.
25. GRIZZUTI, K. & PERLMANN, G.E., Conformation of the phosphoprotein, phosvitin, *J. Biol. Chem.*, **245**(10): 2573-2578, 1970.
26. GRIZZUTI, K. & PERLMANN, G.E., Binding of magnesium and calcium ions to the phosphoglycoprotein phosvitin, *Biochemistry*, **12**(22): 4399-4403, 1973.
27. HAMANN, D.D., PURKAYASTHA, S. & LANIER, T.C., Applications of thermal scanning rheology to the study of food gels, in *Thermal Analysis of Foods*, ed. Harwalkar, V.R. & Ma, C. Y., Elsevier, 1990.

28. HASIAK, R.J., VADEHRA, D.V. BAKER, R.C. & HOOD, L., Effect of certain physical and chemical treatments on the microstructure of egg yolk, *J. Food Sci.*, **37**: 913-917, 1972.
29. HENSE, H., Avaliação dos parâmetros termofísicos e cinéticos do congelamento de Cação, Tese de Mestrado, FEA/UNICAMP, Campinas, 167 págs., 1990.
30. HUNG, T.Y. & SMITH, D.M., Dynamic rheological properties and microstructure of partially insolubilized whey protein concentrate gels, *J. Food Sci.*, **58**(5): 1047-1049, 1054, 1993.
31. KAMAT, V., GRAHAM, G. BARRAT, M. & STUBBS, M., Freeze-thaw gelation of hen's egg yolk low density lipoprotein, *J. Food Sci. Agric.*, **27**: 913-928, 1976.
32. KAMAT, V.B., LAWRENCE, G.A. HART, C.J. & YOELL, R., Contribution of egg yolk lipoproteins to cake structure, *J. Food Sci. Agric.*, **24**: 77-88, 1973.
33. KLEEBERG-HIDALGO, F., Estudo comparativo dos parâmetros termodinâmicos e da cinética de congelamento de filé de pescada (*Cynoscion petramus*) cozido, Tese de Mestrado, FEA/UNICAMP, Campinas, 126 págs., 1986.
34. KLINE, L., MEEHAN, J.J. & SUGIHARA, T.F., Relation between layer age and egg-product yields and quality, *Food Technol.*, 1296-1301, 1965.
35. KOCAL, J.T., NAKAI, S. & POWRIE, W.D., Chemical and physical properties of apolipoprotein of very low density lipoprotein from egg yolk granules, *J. Food Sci.*, **45**: 1756-1767, 1980.
36. KURISAKI, J., KAMINOGAWA, S. & YAMAUCHI, K., Studies on freeze-thaw gelation of very low density lipoprotein from hen's egg yolk, *J. Food Sci.*, **45**: 463-466, 1980.
37. LeCLERC, J.A. & BAILEY, L.H., Fresh, frozen and dried eggs and egg products (their uses in baking and for other purposes), *Cereal Chem.*, **17**: 279-312, 1940.
38. LEVINE, H. & SLADE, L., Principles of "cryostabilization technology" from structure/property relationships of carbohydrate/water systems - a review, *Cryo-Letters*, **9**: 21-63, 1988.
39. LEVINE, H. & SLADE, L., A food polymer science approach to the practice of cryostabilization technology, *Comments Agric. & Food Chem.*, **1**(6): 315-396, 1989.
40. MAHADEVAN, S., SATYNARAYAMA, T. & KUMAR, S.A., Physico-chemical studies on the gelation of hen's egg yolk, *J. Agric. Food Chem.*, **17**(4): 767-772, 1969.
41. MARION, W.W., NORDSKOG, A., TOLMAN, H.S. & FORSYTHE, R.H., Egg composition as influenced by breeding, egg size, age and season, *Poultry Sci.*, **43**: 255-264, 1964.

42. MARION, J.E., WOODROOF, J.G. & COOK, R.E., Some physical and chemical properties of eggs from hens of five different stocks, *Poultry Science*, **44**: 529-534, 1965.
43. MARTIN, W.G., AUGUSTYNIAK, J. & COOK, W.H., Fractionation and characterization of the low-density lipoproteins of hen's egg yolk, *Biochem. Biophys. Acta*, **84**: 714-720, 1964.
44. McCULLY, K.A., MOK, C.C- & COMMON, R.H., Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**: 937-952, 1962.
45. MENEGALLI, F.C. & CALVELO, A., Dendritic growth of ice crystals during the freezing of beef, *Meat Sci.*, **3**: 179-199, 1979.
46. MITCHELL, J.R., The rheology of gels, *J. Text. Studies*, **11**: 315-337, 1980.
47. MIYOSHI, E., TAKAYA, T. & NISHINARI, K., Gel-sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts, *Food Hydrocolloids*, **8**(6): 505-527, 1994.
48. MOHSENIN, N.N., *Physical properties of plant and animal materials*, 2nd ed., Gordon and Breach Science Publishers, New York, 841 págs., 1986.
49. MONZINI, A. & MALTINI, E., Apetti tecnici della congelazione e qualità dei prodotti, *Industrie Alimentari*, 749-770, outubro, 1984.
50. MORAN, T., Effect of low temperature on hen's eggs, *Proc. Roy. Soc. London*, **b98**: 436-456, 1925.
51. NEMA, S. & AVIS, K., Freeze-thaw studies of a model protein, lactate dehydrogenase in the presence of cryoprotectants, *J. Parenteral Sci. Technol.*, **47**(2): 76-83, 1993.
52. NOWAK, C.M., POWRIE, W.D. & FENNEMA, O., Interaction of Low-Density Lipoprotein (LDL) from yolk plasma with methyl orange, *J. Food Science*, **31**: 812-818, 1966.
53. PALMER, H.H., IJICHI, K., ROOFF, H. & REDFERN, S., Sugared egg yolks: effects of pasteurization and freezing on performance and viscosity, *Food Technol.*, **23**(12): 1581-1585, 1969.
54. PHAM, Q.T., A simplified equation for predicting the freezing time of foodstuffs, *J. Food Technol.*, **21**: 209-219, 1986.
55. POWRIE, W.D., LITTLE, H. & LOPEZ, A., Gelation of egg yolk, *J. Food Sci.*, **28**: 38-46, 1963.

56. POWRIE, W.D., Cryopreservation of egg yolk, in *Low temperature preservation of food and living matter*, ed. Fennema, O.R., Marcel Dekker, New York, 264-281, 1973.
57. PRIVETT, O.S., BLANK, M.L. & SCHMIT, J.A., Studies on the composition af egg lipid, *J. Food Sci.*, **27**: 463-468, 1962.
58. REID, S., Fundamental physicochemical aspects of freezing, *Food Technol.*, **4**: 110-115, 1983.
59. RHODES, D.N. & LEA, O.H., Phospholipids. 4. On the composition of hen's egg phospholipids, *Biochem. J.*, **54**: 526-533, 1957.
60. RIEDEL, L., Kalorimetrische untersuchungen über das gefrieren von eiklar und eigelb, *Kaltetechnik*, **8**(9): 342-347, 1957.
61. ROCHEFORT, W. & MIDDLEMAN, S., Rheology of xanthan gum: salt, temperature and strain effects in oscillatory and steady shear experiments, *J. Rheology*, **31**(4): 337-369, 1987.
62. ROMANOFF, A.L. & ROMANOFF, A., *The avian egg*, Wiley, New York, 1949.
63. ROOS, Y. H., Phase transitions and transformations in food systems, in: *Food Engineering Handbook*, ed. Heldman, D. & Lund, D., Marcel Dekker, New York, 145-197, 1992.
64. SAARI, A., POWRIE, W.D. & FENNEMA, O., Isolation and characterization of low-density lipoproteins in native egg yolk plasma, *J. Food Sci.*, **29**: 307-315, 1964a.
65. SAARI, A., POWRIE, W.D. & FENNEMA, O., Influence of freezing egg yolk plasma on the properties of low density lipoproteins, *J. Food Sci.*, **29**: 762-765, 1964b.
66. SATO, Y. & AOKI, T., Influences of various salts on gelation of low density lipoprotein (egg yolk) during its freezing and thawing, *Agric. Biol. Chem.*, **39**(1): 29-35, 1975.
67. SCHMIDT, G., BESSMAN, M.J., HICKEY, M.D. & THANNHAUSER, S.J., The concentrations of some constituents of egg yolk in its soluble phase, *J. Biol. Chem.*, **223**: 1027-1031, 1956.
68. SCHWARTZBERG, H.G., Mathematical analysis of the freezing and thawing of foods, *AICHE Summer Meeting*, 33 págs., Detroit, USA, August, 1981.
69. SLADE, L. & LEVINE, H., Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assesment of food quality and safety, *CRC Critic. Rew. Food Sci. Nutr.*, **30**(2,3): 115-359, 1991.
70. SIMATOS, D., BLOND, G. & Le MESTE, M., Relation between glass transition and stability of a frozen product, *Cryo-Letters*, **10**: 77-84, 1989.

71. SOLIMAN, F.S. & VAN DEN BERG, L., Factors affecting freeze aggregation of lipoprotein, *Cryobiology*, **8**: 265-270, 1971.
72. STADELMAN, W.J. & COTTERILL, O.J., *Egg science and technology*, 3rd ed., AVI Publish. Co., Westport, 1986.
73. STADING, M. & HERMANSSON, A.-M., Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures, *Food Hydrocolloids*, **4**(2): 121-135, 1990.
74. STADING, M., LANGTON, M. & HERMANSSON, A.-M., Inhomogeneous fine-stranded β -lactoglobulin gels, *Food Hydrocolloids*, **6**(5): 455-470, 1992.
75. SYCH, J., LACROIX, C., ADAMBOUNOU, L.T. & CASTAIGNE, F., Cryoprotective effects of some materials on cod-surimi proteins during frozen storage, *J. Food Sci.*, **55**(5): 1222-1227, 1263, 1990.
76. TAYLOR, S.M. & FRYER, P.J., Rhéologies des concentrés de protéines de lactosérum après chauffage: influence de la fraction non-proteinique sur la fermeté du gel, *Entropie*, **168**: 57-64, 1992.
77. YOON, K.S., & LEE, C.M., Cryoprotectant effects in surimi and surimi/mince-based extruded products, *J. Food Sci.*, **55**(5): 1210-1216, 1990.
78. WAKAMATU, T. & SATO, Y., Studies on release of components from frozen-thawed low-density lipoprotein (LDL) of egg yolk, *J. Food Sci.*, **45**: 1768-1772, 1980.
79. WAKAMATU, T., SATO, Y., SAITO, Y., On sodium chloride action in the gelation process of low density lipoprotein (LDL) from hen egg yolk, *J. Food Sci.*, **48**: 507-512, 516, 1983.
80. WAKAMATU, T., SATO, Y., SAITO, Y., Identification of the components responsible for the gelation of egg yolk during freezing, *Agric. Biol. Chem.*, **46**(6): 1495-1503, 1982.
81. WAKAMATU, T., Gelation of low density lipoprotein (LDL) from hen egg yolk during freezing and thawing, *Food Hydrocolloids: Structures, Properties and Functions*, ed. Nishinari, K. & Doi, E., Plenum Press, New York, 1994.
82. WATANABE, T., KITABATAKE, N. & DOi, E., Protective effects of non-ionic surfactants against denaturation of rabbit skeletal myosin by freezing and thawing, *Agric. Biol. Chem.*, **52**(10): 2517-2523, 1988.