

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA SUSTENTABILIDADE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM USO E PLANEJAMENTO DE RECURSOS  
RENOVÁVEIS

JENIFFER DA SILVEIRA GONÇALVES

**PRODUÇÃO DE GÉIS POROSOS POR CONGELAMENTO**

Sorocaba

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA SUSTENTABILIDADE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM USO E PLANEJAMENTO DE RECURSOS  
RENOVÁVEIS

JENIFFER DA SILVEIRA GONÇALVES

**PRODUÇÃO DE GÉIS POROSOS POR CONGELAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Uso e Planejamento de Recursos Renováveis para obtenção do título de Mestre em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis. Área de concentração: Produtos sustentáveis.

Orientação: Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman

Sorocaba

2018

Gonçalves, Jeniffer Silveira

PRODUÇÃO DE GÉIS POROSOS POR CONGELAMENTO / Jeniffer  
Silveira Gonçalves. -- 2018.

78 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus  
Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Dr. Walter Ruggeri Waldman

Banca examinadora: Dr. Nadia Rosa Pereira, Dr. Francisco Trivinho  
Strixino Bibliografia

1. Ice-template. 2. Materiais Porosos. 3. Alginato de cálcio. I.  
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979

**JENIFFER DA SILVEIRA GONÇALVES**

**GÉIS POROSOS POR CONGELAMENTO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação para obtenção do título de mestre em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis.  
Universidade Federal de São Carlos.  
Sorocaba, 22 de junho de 2018.**

**Orientador:**



**Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar Campus Sorocaba**

**Examinadores:**

  
**Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar Campus Sorocaba**

**Certifico que a sessão de defesa foi realizada com a participação à distância da Dra. Nádia Rosa Pereira (Universidade Estadual do Norte Fluminense) e, depois das arguições e deliberações realizadas, a participante à distância está de acordo com o conteúdo do parecer da comissão examinadora redigido no relatório de defesa de Dissertação de Jeniffer da Silveira Gonçalves.**



**Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman  
Presidente da Comissão Examinadora  
UFSCar-So**

## AGRADECIMENTO

Agradeço ao professor Walter, por desde o início me receber de braços abertos, por toda paciência, pelos conhecimentos passados, pelos puxões de orelha, todas as boas conversas e por além de ser um orientador, ser também um amigo.

Agradeço ao pessoal do GPAS, Thiago, Carolina, Amanda e Ana, pelo apoio e pela convivência ótima que tivemos e um obrigado especial ao João Carlos, que auxiliou muito nesse trabalho, à Natália pelas conversas e desabafos e principalmente à Patrícia, por não só ter sido minha colega de trabalho, mas minha amiga e conselheira, sempre.

Ao professor Francisco Strixino pelo uso do laboratório e equipamentos para realização do trabalho e ao Emerson por me auxiliar no trabalho e pela ótima companhia.

Ao meus pais e irmã pela paciência e incentivo e ao meu noivo, Rafael, por me incentivar desde o começo, me apoiar e me motivar todos os dias, muito obrigado!

Ao Departamento de Física, Química e Matemática, por permitir a utilização do laboratório de Química Orgânica, fazendo com que esse trabalho pudesse ser realizado e à técnica Daniela, não só pelo trabalho, mas também pela ótima companhia de todos os dias.

À professora Eliana Duek, por permitir a utilização dos equipamentos do laboratório de biomateriais da PUC de Sorocaba e à Priscila e Carolini, por sempre auxiliarem nas atividades do laboratório.

Ao professor Fábio Yamaji, por permitir a utilização do laboratório de Biomassa e Energia, aos professores Airton Dias e Franciane Pádua por permitir o uso dos equipamentos de microscopia ótica e à Thaís, pelo auxílio.

Agradeço ainda ao CNPEM e LNNaNO, pelos equipamentos disponibilizados, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Uso de Recursos Renováveis (PPGPUR) pelo apoio concedido e a todos que de alguma forma auxiliaram na realização desse trabalho.

## RESUMO

O trabalho aqui apresentado teve como proposta o desenvolvimento de um processo adaptado da técnica de *ice-template*, utilizando como soluto o alginato de sódio um polímero orgânico de fonte renovável e atóxico, que forma estruturas devido a sua capacidade de reticulação quando em contato com íons divalentes, como o  $\text{Ca}^{2+}$ . A utilização de polímeros renováveis junto a processos de baixo custo, para a obtenção de materiais porosos, tem grande relevância para o desenvolvimento da economia sustentável. O objetivo foi promover a simplificação do processo *ice-template*, com menor custo para a técnica a partir de um sistema de congelamento, sem a utilização da técnica de liofilização e a inserção do gel em materiais porosos. Os géis formados foram submetidos a secagem por solventes apolares, caracterização morfológica através da microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), e testes de porosidade e capilaridade. Foi determinado que é possível produzir materiais porosos através de formulações de alginato de cálcio de forma simples, formando materiais de poros multidirecionais e unidirecionais. A formulação de 0,15 g/100 g de alginato de sódio com 0,0010 mol/L de  $\text{CaCl}_2$  foi a melhor até então, para ser usada na formação de géis porosos, por conta do melhor rendimento mássico. A secagem com a utilização de butanol foi a que melhor manteve a integridade estrutural dos géis e os compósitos de café além de auxiliar na estrutura do gel, possibilitou a prospecção para novas aplicações aos géis produzidos. Provamos o conceito de permear a formulação de congelamento em materiais porosos e produzir géis por congelamento dentro de seus poros

**Palavras-chave:** Materiais porosos, Congelamento, *Ice Template*, Biomateriais.

## ABSTRACT

The work presented here had as a proposal the development of a process adapted from the ice-template technique, using as solute sodium alginate an organic polymer of renewable and non-toxic source, which forms structures due to its crosslinking ability when in contact with divalent ions, such as  $\text{Ca}^{2+}$ . The use of renewable polymers together with low cost processes for obtaining porous materials has great relevance for the development of a sustainable economy. The objective was to promote the simplification of the ice-template process, with lower cost for the technique from a freezing system, without the use of the lyophilization technique and the insertion of the gel into porous materials. The formed gels were submitted to drying by apolar solvents, morphological characterization by optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM), and porosity and capillary tests. It has been determined that it is possible to produce porous materials through calcium alginate formulations in a simple manner, forming multidirectional and unidirectional pore materials. The formulation of 0,15 g/100g of sodium alginate with 0,0010 mol/L of  $\text{CaCl}_2$  was the best so far, to be used in the formation of porous gels, because of the best mass yield. Drying with the use of butanol was the one that best maintained the structural integrity of the gels and the coffee composites besides helping the gel structure, allowed the prospection for new applications to the gels produced. We have proven the concept of permeating the freezing formulation in porous materials and producing freezing gels inside their pores

**Keywords:** Porous Materials, Freezing, Ice Template, Biomaterials.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas porosas naturais. A) Imagem microscópica do xilema de uma planta, evidenciando os poros usados como canais para passagem de seiva; B) Poros de um osso observados após corte transversal, utilizados na irrigação do tecido ósseo; C) Imagem microscópica do nácar, estrutura porosa encontrada em conchas marinhas.....	17
Figura 2. Esquema do processo de congelamento da técnica de <i>ice template</i> , sendo : A) preparo da formulação cerâmica usada para a produção dos materiais; B) evolução dos cristais de gelo, e precipitação do soluto, com consequentemente aumento da concentração; C) sublimação do solvente, com a estrutura mantendo a replica exata dos cristais de gelo que haviam sido formados; D) sinterização para manutenção da estrutura formada. ....	21
Figura 3. Representação da influência das condições de congelamento na morfologia dos cristais obtidos. ....	22
Figura 4. Diferentes morfologias em função da formulação: A) Sacarose a 4% B) Sacarose a 10% e pH de 2,5, C) Cloreto de sódio a 4%. ....	22
Figura 5. Esquema de formação de materiais porosos por congelamento multidirecional (A) e unidirecional (B), enfatizando o sentido da troca de calor. ....	23
Figura 6. Esquema do dedo frio utilizado para congelamento na técnica de <i>ice template</i> para produção de géis unidirecionais. ....	24
Figura 7. Estrutura dos blocos G e M que compõe a estrutura química do alginato de sódio. ....	27
Figura 8. Esquema da reticulação do alginato de sódio com íons de cálcio ....	28
Figura 9. Representação das diferentes etapas do processo de congelamento proposto neste projeto: sendo respectivamente: solução de subgelificação de alginato e $Ca^{2+}$ ; evolução dos cristais de gelo, aumento das concentrações de alginato e $Ca^{2+}$ ; formação de gel de alginato, em função da concentração crescente; cristais de gelo penetrando no gel de alginato, formando poros; descongelamento da água, o gel poroso permanece estável. ....	29
Figura 10. Condições e concentrações dos primeiros testes de análise das melhores formulações para produção de géis por alginato de cálcio por congelamento com a utilização de água mineral ....	32
Figura 11. Esquema da secagem dos géis por polaridade decrescente utilizando etanol, butanol e acetato de etila ....	34
Figura 12. Método de secagem utilizado para retirada de água dos géis através da utilização de concentrações crescentes de etanol.....	34
Figura 13. Sistema composto por placa <i>Peltier</i> e <i>waterblock</i> e banho termostático .....	36

Figura 14. Revestimento de isopor utilizado para diminuir a intensidade da troca de calor entre o sistema e o ambiente.....	37
Figura 15. Registro das temperaturas das amostras em teste com processo interrompido em tempos de 58 minutos, 127 minutos , 198 minutos e 240 minutos de processo de congelamento .....	39
Figura 16. Faixa readequada para os testes da segunda condição de formulações .....	42
Figura 17. Faixa readequada para os testes da segunda condição de formulações .....	43
Figura 18. Poros da superfície do gel formado por congelamento e liofilizado, em magnificação de 150x .....	44
Figura 19. Corte transversal do gel formado por congelamento, possibilitando a visualização da diferença morfológica entre a superfície e o interior da estrutura, magnificação de 150x.....	45
Figura 20. Espessura da parede do gel produzido por congelamento, com aproximadamente 900nm e magnificação de 20.000x .....	45
Figura 21. Faixa readequada para os testes da terceira condição de formulações.....	47
Figura 22. Gráficos de contorno de massa seca, massa molhada e dos rankings, para mostrar a diferença entre aspecto visual e rendimento mássico dos géis formados na condição 3 .....	48
Figura 23. Gráficos de contorno de massa seca, massa molhada e dos rankings, para mostrar a diferença entre aspecto visual e rendimento mássico dos géis formados na condição 4 .....	48
Figura 24. Gel reforçado com solução concentrada de CaCl <sub>2</sub> seco a temperatura ambiente (esquerda) e estufa (direita). .....	50
Figura 25. Géis após secagem por solventes apolares e dessecador: Etanol, butanol, acetato de etila. ....	50
Figura 26. Géis colapsados após a tentativa de através da desidratação progressiva utilizando etanol. ....	51
Figura 27. Compósito de café após descongelamento.....	52
Figura 28. Compósito de café após a retirada do tubo (A) mostrando que houve a integridade do gel, (B) gel após a secagem em estufa, não apresentando sinais de colapso.....	52
Figura 29. Resultado da primeira tentativa de experimento com espumas mergulhadas em formulação de congelamento.....	53
Figura 30. Microscopia óptica das amostras de esponja. A: esponja embebida com azul de metileno, em magnificação de 50x (A-1) e 200x (A-2); B: esponja embebida com formulação de congelamento e azul de metileno em magnificação de 50x (B-1) e 200x (B-2). ....	54

Figura 31. Microscopia óptica das amostras de esponja após lavagem. A: embebida em azul de metileno em magnificação de 200x; B-1 e B-2: formulação de congelamento e azul de metileno em magnificação de 200x. ....	56
Figura 32. Microscopia óptica das amostras de cerâmica após lavagem (A) pura com azul de metileno em magnificação de 100x; (B) com formulação de congelamento e azul de metileno em magnificação de 200x. ....	57
Figura 33. Gel unidirecional formado no processo de congelamento pelo sistema com placa Peltier. ....	57
Figura 34. Microscopia óptica da superfície do gel unidirecional, figura A em magnificação de 50x e B em magnificação de 200x. ....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de minerais Água Mineral Lindoya .....	67
Tabela 2. Composição de minerais Água Mineral Crystal .....	68
Tabela 3. Análise visual do aspecto da formulação após armazenamento em temperatura ambiente e refrigerador.....	70
Tabela 4. Viscosidade (m/s <sup>2</sup> ) das amostras de água e media da viscosidade da formulação ao longo de 7 dias.....	70
Tabela 5. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 1 feita com o uso de água destilada .....	71
Tabela 6. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações feitas com água destilada.....	71
Tabela 7. Aspecto visual dos géis formados utilizando água destilada, seguindo as notas determinadas na Tabela 6 .....	71
Tabela 8. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 2 feita com o uso de água destilada .....	72
Tabela 9. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações feitas com água destilada.....	72
Tabela 10. Aspecto visual dos géis formados utilizando água destilada, seguindo as notas determinadas na Tabela 9 .....	72
Tabela 11. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 1 feita com o uso de água deionizada .....	73
Tabela 12. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações feitas com água deionizada .....	73
Tabela 13. Aspecto visual dos géis formados utilizando água deionizada, seguindo as notas determinadas na Tabela 12 .....	73
Tabela 14. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 2 feita com o uso de água deionizada .....	73
Tabela 15. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações feitas com água deionizada .....	74
Tabela 16. Aspecto visual dos géis formados utilizando água deionizada, seguindo as notas determinadas na Tabela 15 .....	74
Tabela 17. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 3.....	74
Tabela 18. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações .....	75

Tabela 19. Aspecto visual dos géis formados, seguindo as notas determinadas na Tabela 18	75
Tabela 20. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 4.....	75
Tabela 21. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações. ....	75
Tabela 22. Ranking dos aspectos visuais dos géis formados, seguindo as notas determinadas na Tabela 21 .....	76

## LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1. Temperaturas observadas no sistema após 250 minutos do processo de congelamento .....	38
Gráfico 2. Gráfico de contorno que apresenta as formulações analisadas na varredura 1, com o uso de água destilada .....	41
Gráfico 3. Gráfico de contorno que apresenta as notas dadas nas formulações analisadas na varredura 1 .....	43
Gráfico 4. Gráfico de contorno que apresenta as notas dadas nas formulações analisadas na condição 3 .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Blocos G	Bloco de ácido a-L-gulurônico
Blocos M	Bloco de ácido b-D manurônico
Ca <sup>2+</sup>	Íon de cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
g	Gramma
L	Litro
LME	Laboratório de microscopia eletrônica
LNNano	Laboratório Nacional de Nanotecnologia
μL	Microlitro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PUC	Pontifícia Universidade Católica
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	19
2.1	O uso do congelamento .....	19
2.2	Gelo .....	19
2.3	Ice template.....	20
2.4	Propriedades dos materiais porosos feitos pela técnica de <i>ice-template</i> .....	24
2.5	Aplicações .....	26
2.6	Alginato .....	27
3	PROPOSTA DE TRABALHO .....	29
4	METODOLOGIA/MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
4.1	Reagentes e pureza de materiais utilizados .....	31
4.2	Caracterização do sistema de congelamento .....	31
4.3	Caracterização das etapas de congelamento dos géis .....	31
4.4	Exploração de parâmetros experimentais para formulação com formação de gel 31	
4.5	Secagem dos géis produzidos por congelamento .....	33
4.5.1	Liofilização.....	33
4.5.2	Secagem do gel com solventes apolares .....	33
4.5.2.1	Secagem com solventes de polaridade decrescente .....	33
4.5.2.2	Secagem com etanol.....	34
4.6	Produção de compósitos de café com alginato de cálcio.....	34
4.7	Formação de gel após permeação em materiais porosos.....	35
4.8	Gel unidirecional .....	36
5	Métodos de análises e caracterização visual .....	37
5.1	Fotografia digital .....	37

5.2	Microscopia ótica .....	37
5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
6	RESULTADOS .....	38
6.1	Caracterização do sistema de congelamento .....	38
6.2	Caracterização das etapas de congelamento dos géis .....	39
6.3	Exploração de parâmetros experimentais para formulação com formação de gel 41	
6.3.1	Exploração de parâmetros utilizando água destilada .....	41
6.3.2	Exploração de parâmetros utilizando água deionizada .....	42
6.4	Uso de água mineral como solvente .....	46
6.4.1	Exploração de parâmetros utilizando água mineral .....	46
6.5	Secagem do gel com solventes apolares.....	49
6.6	Produção de compósitos de café com alginato de cálcio.....	51
6.7	Formação de gel após permeação em materiais porosos.....	53
6.8	Gel unidirecional .....	57
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	59
8	SUGESTÕES FUTURAS.....	60
	APÊNDICE - A.....	67
	ANEXO I – Viscosidade e degradação da formulação após o armazenamento .....	69
	ANEXO II – Dados da exploração de parâmetros experimentais para formulação com formação de gel .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

Poros fazem parte do nosso dia-a-dia de inúmeras formas e estão presentes onde menos esperamos, ainda que não possam ser observados. Eles estão nas paredes de uma casa, na parte interna de capacetes, na espuma de geladeiras e nas esponjas que usamos para lavar louça. Essa presença constante mostra a importância de conhecer essas estruturas, que podem ser tão pequenas, mas fazem parte das nossas vidas (SANTOS et al, 2015).

Poros nada mais são que cavidades dentro de um material, que apesar de num primeiro momento parecer que poderiam fragilizar uma estrutura por ser uma descontinuidade, na verdade podem favorecer diversas aplicações. Em um material poroso a porção dos poros é preenchida por ar, que deixa o material mais leve e menos denso, uma vez que a densidade é definida pela razão entre a massa e o volume de um sólido (GREGG; SING, 1997).

As aplicações para materiais de característica porosa têm relação com o tipo de poro que a estrutura apresenta, ou seja, diferentes porosidades têm diferentes aplicações (ISHIZAKI; KOMARNENI; NANKO, 1998), por exemplo, materiais com porosidade multidirecional e grande pode ser utilizado para crescimento celular (SADER; FERREIRA; DIAS, 2006), enquanto porosidades controladas, como a estudada por Silva e Galembeck (2015), têm características que favorecem a remoção de corantes contaminantes de água.

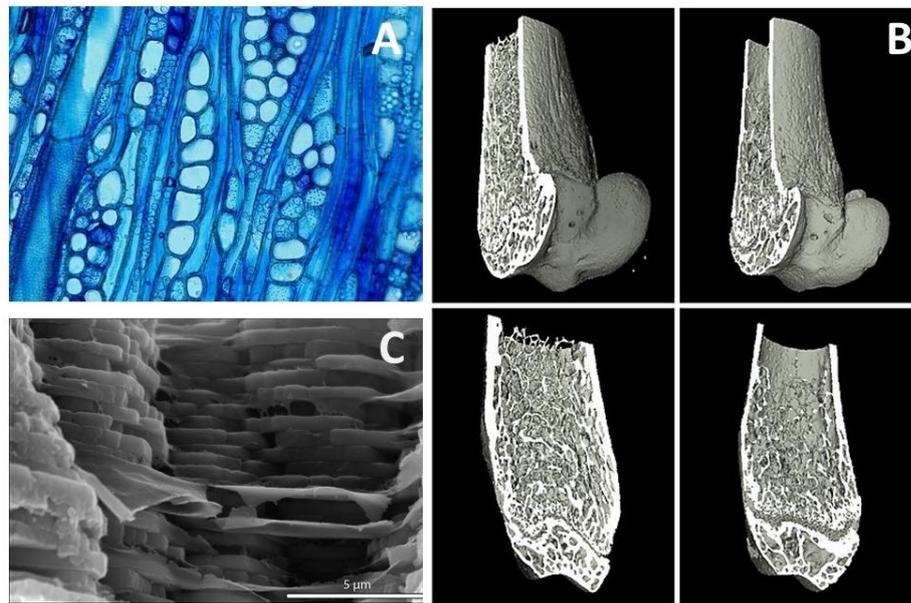
A diferença na porosidade dos materiais levou às classificações para os tipos de poros em função do seu tamanho: microporos, são poros com tamanho menores de 2nm; mesoporos, têm tamanhos entre 2 e 50nm e macroporos, têm tamanhos acima de 50nm (SING, 1985).

Quando os poros não possuem conexão suficiente entre si, atuam como isolantes térmicos dificultando a troca de calor e quando possuem boa conexão entre si, o que é chamado de interconectividade, podem permitir a passagem de fluídos, atuando como elemento filtrante. No caso de haver funcionalização das paredes de um poro, o elemento filtrante pode ter seletividade, agregando valor ao material (NUNES et al., 2010)

A formação de poros não é uma exclusividade tecnológica ou científica. A partir de exemplos simples é notável que as estruturas naturais têm muitas inspirações para produção e uso de poros. A ciência aproveita as ideias para criar aplicações que facilitem nossa vida através das estruturas únicas que já estão presentes no nosso planeta e se inspira para a fabricação de novos materiais porosos artificiais que nos ajudam a entender e imitar a natureza (HOU; JIANG, 2009).

Estruturas naturais (Figura 1), como plantas e células, possuem poros com o objetivo de transportar fluídos (SCHONHERR, 2006), os poros encontrados em ossos tem a habilidade de transportar os nutrientes necessários para a manutenção e sobrevivência dos tecidos (WU et al., 2011) e a madreperla, encontrada em muitas conchas, apresenta uma grande quantidade de poros (HOU, 2016).

**Figura 1. Estruturas porosas naturais. A) Imagem microscópica do xilema de uma planta, evidenciando os poros usados como canais para passagem de seiva; B) Poros de um osso observados após corte transversal, utilizados na irrigação do tecido ósseo; C) Imagem microscópica do nácar, estrutura porosa encontrada em conchas marinhas.**



Fonte: (a) Reprodução de MDSAHLJMI0, 2017, b) Adaptado de KAWAMURA, 2007, c) Reprodução de DEVILLE, 2016.

Outro material natural que apresenta grande quantidade de poros é a madeira. Os poros influenciam significativamente em várias de suas propriedades como fluxo, adsorção, impregnabilidade, condutividade térmica e resistência à tração e flexão (PLÖTZE; NIEMZ, 2010).

Uma das técnicas utilizadas para a produção de materiais porosos é o *ice template*, ou *freeze-casting*, que utiliza o congelamento para este fim (DEVILLE, 2008). Nesse trabalho serão apresentados os conceitos relacionados a esta técnica de produção de materiais porosos, as aplicações para as estruturas produzidas utilizando essa técnica e será apresentada uma técnica de produção de poros através do congelamento do alginato de sódio, um polímero que tem a capacidade de formação de gel. O objetivo desse trabalho foi buscar um método de baixo custo de produção de material poroso e formar gel dentro de outras estruturas porosas.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 O uso do congelamento**

O congelamento tem sido usado desde os tempos pré-históricos para preservar alimentos. Habitantes de locais com baixa temperatura já conservavam seus alimentos com o congelamento e notaram não havia perda da qualidade da comida (COLLA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003). A preservação de mantimentos se desenvolveu junto com as civilizações e no período de descobrimento de novos continentes através das navegações, a necessidade de meios para preservação foi de grande importância. Em um diário de bordo de uma das tripulações que procuravam rotas alternativas para o continente asiático pelo norte do planeta, foi encontrada uma referência sobre o armazenamento e conservação de alimentos através de baixas temperaturas. Galpões de estocagem foram espalhados pelos locais frios, para que os marinheiros pudessem reabastecer os navios, já que as viagens eram demasiadamente longas. (FRANKS; AUFFRET, 2007).

Até então, ainda que houvesse o conhecimento sobre a preservação pelo frio, não se sabia, nem haviam métodos de controle do modo como o congelamento acontecia, então foi observado que alguns alimentos tinham seu sabor alterado e barris de cerveja armazenados vazavam após serem submetidos a baixas temperaturas (FRANKS; AUFFRET, 2007). Hoje em dia temos muito mais informações sobre o congelamento, sabe-se que existem diferenças entre resfriar e congelar. O processo de resfriamento se baseia em redução da atividade metabólica próximo a temperaturas de 0°C, enquanto que no congelamento há privação de O<sub>2</sub> e os cristais de gelo podem romper paredes celulares e provocar o vazamento de líquido intracelular (FRANKS; AUFFRET, 2007). Além da quantidade de informações que temos sobre a preservação através do frio, equipamentos que permitem o uso fácil da técnica e o controle das taxas de temperatura foram desenvolvidos, como a geladeira de uso doméstico, facilitando muito nosso cotidiano. (JAMES; ONARINDE; JAMES, 2016).

### **2.2 Gelo**

A água cobre cerca de 71% do planeta, sendo a substância mais abundante no mundo (GUTIÉRREZ; FERRER; MONTE, 2008). Com as baixas temperaturas acima e abaixo do Equador, é de se esperar que o gelo seja um dos materiais sólidos mais comuns e que desempenhe papel importante em áreas como meteorologia, biologia, ciências ambientais, química, entre outras (LIBBRETCH, 2017).

O gelo é produto do processo de cristalização de moléculas de água quando submetidas a baixas temperaturas (LIBBRETCH, 2017). A cristalização ocorre após uma etapa inicial de formação de sítios de nucleação do gelo, onde núcleos de gelo são formados e logo após ocorre a etapa de crescimento dos cristais, que nada mais é do que o alargamento dos núcleos de gelo, onde novas moléculas também são influenciadas a se difundir e durante essa transição de fases da molécula de água, ocorre a quebra de ligações de hidrogênio que tem como consequência o aumento da energia interna da água em difusão, provocando um processo endotérmico, ou seja, liberando calor (COLLA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003; DEVILLE, 2010; ICKES et al, 2014)..

O congelamento sofre influência não apenas dos fatores físicos em que é submetido, mas também das propriedades químicas envolvidas. O tempo de congelamento muda de acordo com substâncias presentes no solvente que está sendo congelado e tamanho de partículas dispersas no meio (LIU; BUTTON, 2013). Partículas dispersas na água durante a formação de gelo alteram a taxa de resfriamento devido à sua diferente capacidade calorífica, por esse motivo a temperatura sofre oscilações quando comparado com o congelamento do solvente puro (DEVILLE, 2010; BIGLIA et al, 2016).

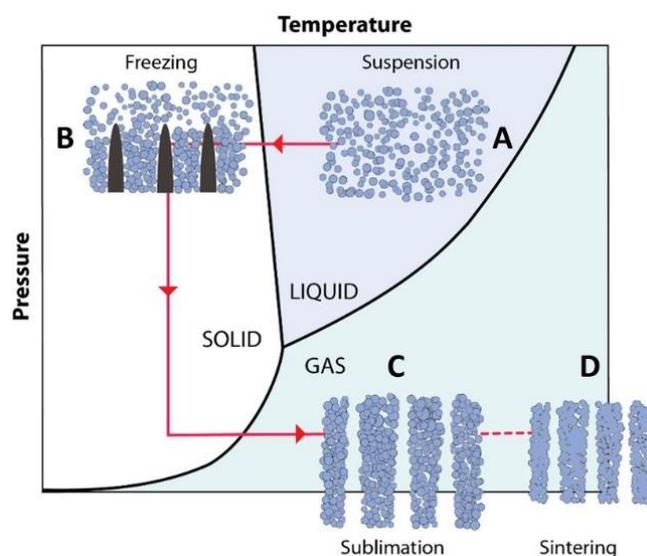
Com o objetivo de compreender a participação de partículas no congelamento, Deville (2010) estudou os cristais de gelo em uma suspensão com alumina e notou que a temperatura de congelamento é alterada pelo tamanho das partículas e que partículas pequenas alteram a taxa de resfriamento, enquanto as grandes oferecem menores sítios de nucleação do gelo por ocuparem mais espaço. Libbrecht (2017), que também analisou a influência de partículas no gelo, notou que a presença de solutos em soluções aquosas altera o ponto de congelamento, de acordo com a concentração da solução.

### **2.3 Ice template**

A técnica de *ice template*, que utiliza os cristais de gelo para a produção de materiais porosos cerâmicos é um método fácil e de baixo impacto ambiental que permite produzir estruturas porosas (MORITZ; RITCHER, 2007; LIU; XU; WANG, 2016). O processo para formar poros através do gelo pela técnica é simples, por isso é usado há mais de 60 anos e ainda tem muito a oferecer (DEVILLE, 2008).

O uso desse método para a preparação de materiais cerâmicos porosos é composto por quatro passos (Figura 2): preparo da dispersão de cerâmicos (adição de solutos não-voláteis, co-solventes, particulados cerâmicos); congelamento com condições controladas; sublimação do solvente para a formação dos espaços vazios e sinterização dos cerâmicos, que aglutina as partículas do material para manter sua estrutura (YOON et al., 2007).

**Figura 2. Esquema do processo de congelamento da técnica de *ice template*, sendo : A) preparo da formulação cerâmica usada para a produção dos materiais; B) evolução dos cristais de gelo, e precipitação do soluto, com consequentemente aumento da concentração; C) sublimação do solvente, com a estrutura mantendo a replica exata dos cristais de gelo que haviam sido formados; D) sinterização para manutenção da estrutura formada.**

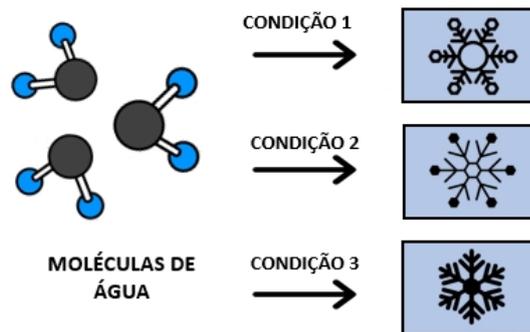


Fonte: Adaptado de DEVILLE, 2016

Para criar diferentes morfologias de poros, usualmente interfere-se no congelamento com a presença de solutos não-voláteis ou co-solventes (LIU; XU; WANG, 2016) que interferem tanto na nucleação do gelo, quanto na sua cinética de crescimento (DEVILLE, 2010). Munch et al (2009) realizou um estudo de produção de materiais através de *ice template* utilizando aditivos que alterassem as taxas de congelamento, como cloreto de sódio e sacarose; outros que pudessem alterar o pH das formulações, como o ácido cítrico e ainda fez alteração de viscosidade, adicionando gelatinas.

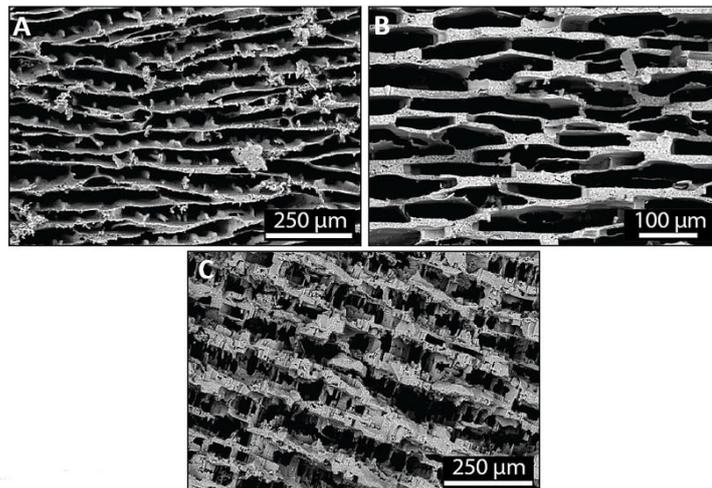
O objetivo da inserção de aditivos às formulações foi explorar a manipulação dos materiais congelados através da alteração dos processos de congelamento. Foi observado que quando submetidos a diferentes condições (Figura 3) e aditivos, os poros de uma estrutura também são alterados (Figura 4), porque há a influência nos parâmetros físicos do congelamento, causando diferença na formação dos cristais e consequentemente no formato dos poros (MUNCH et al, 2009)

**Figura 3. Representação da influência das condições de congelamento na morfologia dos cristais obtidos.**



Fonte: Elaboração própria

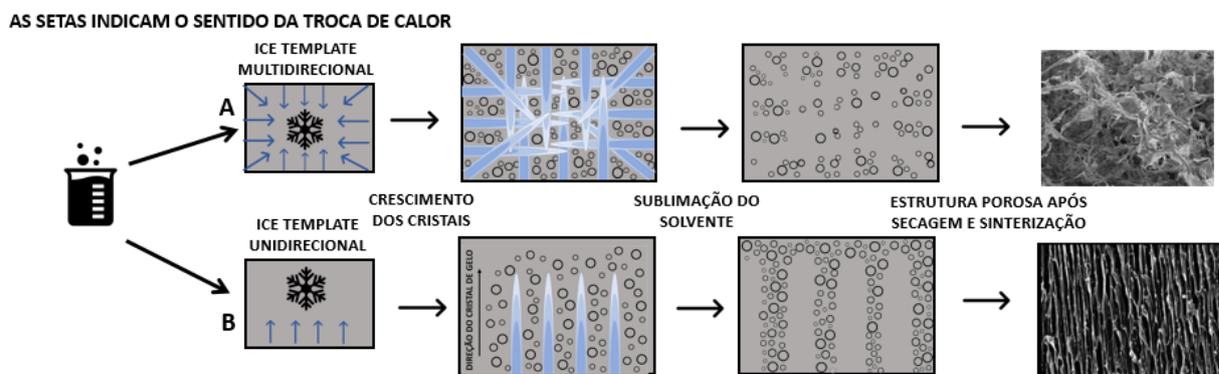
**Figura 4. Diferentes morfologias em função da formulação: A) Sacarose a 4% B) Sacarose a 10% e pH de 2,5, C) Cloreto de sódio a 4%.**



Fonte: Reprodução de DEVILLE, 2016.

Outro fator que pode influenciar na morfologia de um material poroso, é a direção em que ocorre a troca de calor entre o sistema que será congelado e o ambiente com menor temperatura. No caso da bandeja de gelo que se costuma colocar em um congelador, a água troca calor com o meio de menor temperatura (o congelador) por todas as direções, portanto o crescimento do gelo será aproximadamente multidirecional (Figura 5-A). Quando o sistema que deve ser congelado é colocado em um ambiente com isolamento térmico, favorecendo que a troca de calor aconteça em apenas uma direção, o congelamento será unidirecional (Figura 5-B). (ZHU et al, 2013)

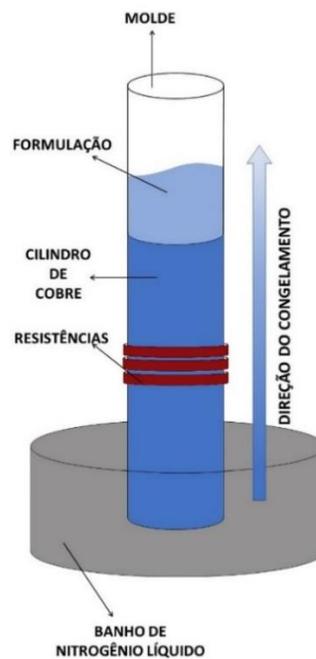
**Figura 5. Esquema de formação de materiais porosos por congelamento multidirecional (A) e unidirecional (B), enfatizando o sentido da troca de calor.**



Fonte: Elaboração própria

Para o congelamento unidirecional na técnica de *ice template*, um equipamento chamado dedo frio (Figura 6) é utilizado, para facilitar o controle dos cristais de gelo e temperatura do sistema. O dedo frio é composto por um molde, onde é colocada a formulação a ser congelada, conectado a um cilindro de cobre mantido em banho de nitrogênio líquido. Para ajudar no controle das taxas de resfriamento há resistências acopladas ao cilindro, permitindo controlar a troca de calor, e, portanto, a temperatura do sistema (WEGST et al, 2010).

**Figura 6. Esquema do dedo frio utilizado para congelamento na técnica de *ice template* para produção de géis unidirecionais.**



Fonte: Elaboração própria

Entre as razões para o uso da técnica de *ice template*, está a possibilidade de utilização de vários materiais diferentes, como polímeros, biomassa (DUTTA; BHAUMIK; WU, 2014), cerâmicas e metais (DEVILLE; MEILLE; SEUBA, 2015) e ainda o controle das propriedades físicas da estrutura criada (WEGST et al, 2010).

#### **2.4 Propriedades dos materiais porosos feitos pela técnica de *ice-template***

Como já vimos anteriormente, o material produzido através de *ice template* pode apresentar diferentes porosidades, pois sofre influência de vários fatores como a taxa de resfriamento, temperatura, tipo de solventes e solutos (DEVILLE, 2010). Após conhecer a presença, importância e como ocorre a formação de poros através do congelamento, é importante entender as propriedades dos materiais porosos e sua estrutura, pois assim podemos entender para que e onde esses materiais podem ser utilizados.

Entre as propriedades de um material poroso está a densidade, área de superfície, formato e distribuição dos poros, porosidade, interconectividade, capilaridade do material e propriedades mecânicas (ZUO; ZENG; JIANG, 2008). A resistência dos materiais porosos sofre influência do tamanho dos poros, já tendo sido observado que poros menores conferem maior resistência à compressão (DEVILLE, 2010). A direção dos poros também influencia nas propriedades mecânicas de um material, por exemplo, poros unidirecionais, por apresentarem uma direção definida tem um comportamento resposta anisotrópico (DEVILLE, 2010).

Para entender melhor como isso funciona, imagine que uma estrutura tem poros que seguem a direção vertical e a passagem de fluídos em que é submetido ocorre no sentido horizontal. Os poros canalizados não conseguem cumprir sua função de canal de passagem, pois o fluído não consegue fluir por dentro do material, portanto é necessário que o sentido do fluído seja no mesmo sentido dos poros.

O tamanho e distribuição dos poros de um material são propriedades importantes e em algumas situações, materiais com poros maiores são os de maior interesse para novas tecnologias (DEVILLE, 2010), mas não necessariamente isso é uma regra. Pelekani e Snoeyink (2000) observaram que na adsorção de corantes, quanto maior a distribuição e tamanho dos poros, menor foi a taxa de adsorção já que havia menor quantidade de material para adsorver esses corantes, mostrando a relevância da área superficial de materiais porosos em fenômenos de superfície. Interconectividade, que é a quantidade de sobreposição entre poros (MOORE et al., 2004), e a capilaridade, que auxilia o transporte de fluidos pelos poros de um material (BAI et al, 2015).

## 2.5 Aplicações

Biomateriais são materiais com habilidade de substituir ou reparar funções biológicas, ter compatibilidade com o ambiente biológico e serem inertes, ou seja, não apresentarem interferências no sistema biológico de um hospedeiro (DROTLEFF et al, 2004; LEE; MOONEY, 2012). Os biomateriais podem ser classificados como passivos, que não possuem função específica; interativos, que promovem melhora de processos ou bioativos, que apresentam fármacos, células ou substâncias que são liberadas quando utilizados (PAUL; SHARMA, 2004). Um dos tipos mais utilizados são os bioativos, especialmente para transplantes ósseos. Os poros desses materiais simulam os canais existentes nos ossos que tem a função de nutrir e promover a capilaridade e vascularização dos tecidos, ajudando na regeneração dos ossos (BAI et al, 2015). Neste contexto o processo de fabricação de biomateriais porosos objetiva simular o material ósseo, caracterizado por ser poroso e com canais direcionados, como os obtidos por processos de congelamento unidirecionais.

Há muito interesse no desenvolvimento de diversos produtos usados como meio de suporte para a área biomédica. Entre as propriedades para determinar um bom suporte estão a porosidade, interconectividade e tamanho dos poros nas estruturas produzidas (MAO et al, 2012). Visto que materiais produzidos por *ice template* oferecem a capacidade de auxiliar o crescimento celular por conta das características porosas, são fortes candidatos para a utilização na produção desses suportes. Além dos estudos em relação a área médica, materiais porosos também são de interesse em processos de retirada de CO<sub>2</sub> da atmosfera por adsorção, membranas para produção energética em reatores catalíticos, como células combustíveis usados na produção de metano através da atividade enzimática de microrganismos e membranas com nanotubos de carbono utilizadas no tratamento e dessalinização de água (GAUDILLERE e SERRA, 2016).

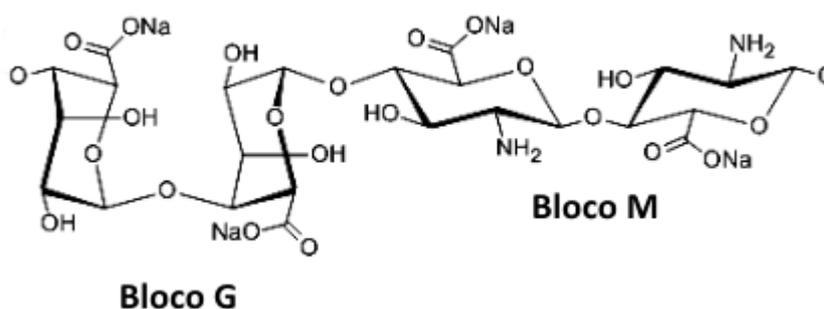
Loo et al (2013) desenvolveu criogeis de polímeros superabsorventes por *ice template* para purificação de água e para remoção da turbidez, alcançando eficiência em remoção de partículas. Estes materiais podem ser usados também na remoção de patógenos em fontes contaminadas através da absorção de água e retenção dos particulados. Seguindo a mesma ideia de aplicação, Gawryla e Schiraldi (2009) criaram materiais absorventes por *ice template* utilizando aerogéis de argila com capacidade de adsorção de componentes tóxicos de águas contaminadas.

## 2.6 Alginato

A utilização de polímeros para a produção de materiais porosos por *ice template* é uma área de estudo. Francis et al. (2013) utilizou alginato para produzir materiais que auxiliassem na engenharia de tecidos neurais. O alginato é um polissacarídeo linear hidrossolúvel, composto por blocos alternados de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) unidos por ligações tipo (1 $\rightarrow$ 4) e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G). Apesar de já ser encontrado em sua forma isolada desde 1883, detalhes sobre a estrutura do polímero só começaram a ser descobertos em 1929, por Nelson e Cretcher (HIRST et al., 1939).

A geometria dos blocos M e G diferem entre si (Figura 7), sendo que os blocos G tem uma estrutura empilhada, enquanto o bloco M tem uma estrutura estendida, o que gera diferença na forma como ocorre a reticulação do alginato, que é uma característica do polímero para promover a formação de géis (GEORGE e ABRAHAM, 2006).

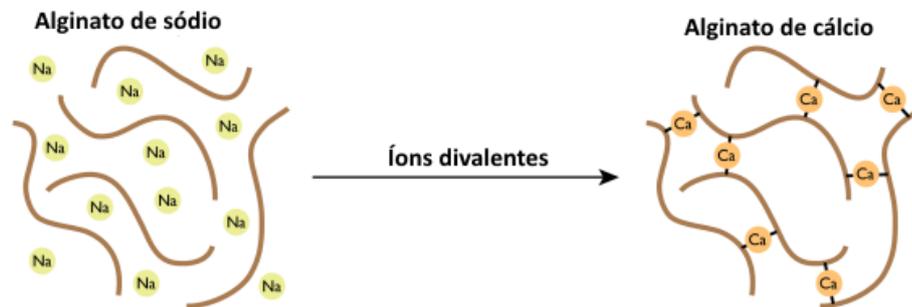
**Figura 7. Estrutura dos blocos G e M que compõe a estrutura química do alginato de sódio.**



Fonte: Adaptado de NGUYEN, 2014.

A reticulação acontece pelo contato com cátions divalentes, como o  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 8). O cátion se liga aos blocos do alginato, ocupando o espaço dos íons de sódio, formando uma estrutura chamada de *egg-box*, logo há a formação de estruturas do tipo fita, onde há o início da reticulação, mas apresenta menor resistência. Conforme as reticulações em fitas aumentam, elas se unem, formando uma estrutura mais forte e de caráter irreversível. (GEORGE; ABRAHAM, 2006; LEE e MOONEY, 2012).

Figura 8. Esquema da reticulação do alginato de sódio com íons de cálcio



Fonte: Adaptado de Science & Food, 2013.

Ainda que os géis de alginato sejam compostos por 99% de água a variação da quantidade de cálcio interfere na permanência do gel. Concentrações muito baixas desses íons geram uma solução viscosa, enquanto que seu induz reticulações permanentes e irreversíveis (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

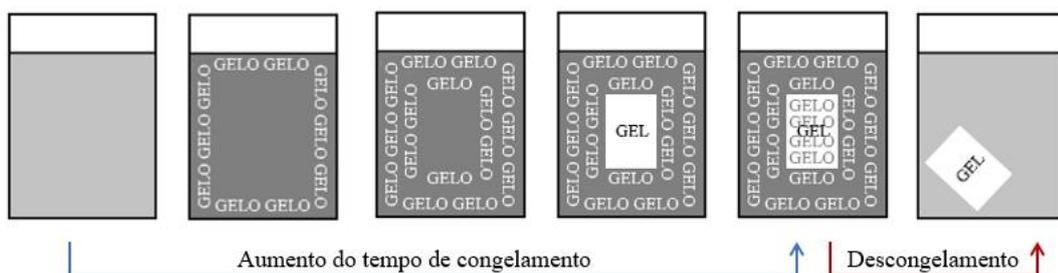
Os alginatos comerciais, provém de três espécies diferentes de algas marrons: *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* ou microrganismos das espécies *Pseudomonas* e *Azobacter vinelandii* (GEORGE; ABRAHAM, 2006). De acordo com o local e espécie de onde é retirado, a ordem de monômeros difere e tem influência nas reticulações dos géis. Blocos G, por apresentarem uma cadeia mais extensa que blocos M, quando ligados entre si, apresentam estruturas mais resistentes e os íons de cálcio tem maior afinidade a esses blocos (PAWAR; EDGAR, 2012; FARRÉS; NORTON, 2014), enquanto as sequências com maiores quantidades de bloco M formam estruturas mais elásticas (FARRÉS; NORTON, 2014).

### 3 PROPOSTA DE TRABALHO

A proposta desse trabalho foi o desenvolver de um processo similar ao *ice template* convencional com menor custo através da substituição do equipamento de dedo frio pelo resfriamento em congelador doméstico e com a substituição da etapa de liofilização pela secagem por troca de solventes com variação de polaridade.

Para a execução do trabalho foram utilizadas formulações de alginato de cálcio em concentrações abaixo da necessária para a reticulação, que é uma característica que não foi observada na literatura até o momento. Essa peculiaridade das formulações utilizadas ocorre com uma solução homogênea (ou seja, em situação de pré-reticulação, onde não há formação de gel) que tem a capacidade de permear por outros materiais, por ser líquida. Supõe-se que a formação de gel (Figura 9) acontece durante o congelamento dessa formulação, pois a cristalização da água proporciona o aumento da concentração do soluto (BIGLIA et al, 2016), permitindo que haja quantidades suficientes para que se promova a reticulação do alginato, causando a formação de gel

**Figura 9. Representação das diferentes etapas do processo de congelamento proposto neste projeto: sendo respectivamente: solução de subgelificação de alginato e  $\text{Ca}^{2+}$ ; evolução dos cristais de gelo, aumento das concentrações de alginato e  $\text{Ca}^{2+}$ ; formação de gel de alginato, em função da concentração crescente; cristais de gelo penetrando no gel de alginato, formando poros; descongelamento da água, o gel poroso permanece estável.**



Fonte:

Elaboração própria

Os poros da estrutura, assim como na técnica de *ice-template*, são formados através da perfuração do gel polimérico pelos cristais de gelo que continuam crescendo até a total solidificação do sistema. O gel poroso permanece estável após o descongelamento, pois já apresenta uma estrutura, devido a característica do alginato de sódio reticulado com íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , que exibem uma interação irreversível, ao contrário da técnica convencional, que necessita da etapa de liofilização para manutenção da estrutura porosa. O congelamento da formulação para a produção de géis porosos deve ocorrer de forma lenta para permitir a difusão dos solutos, garantindo a concentração mais homogênea possível na parte do sistema que ainda será congelado, para que seja efetiva a formação de gel.

## **4 METODOLOGIA/MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Reagentes e pureza de materiais utilizados**

A produção de géis foi feita utilizando o alginato Protanal SF 120 RB (FMC Health and Nutrition) extraído das folhas de *Laminaria hyperborica*. Esse alginato possui em sua composição monomérica 36% de blocos MM, 38% de blocos MG + GM e 26% de blocos GG.

A reticulação dos géis foi feita com o uso de solução de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  da marca Anidrol.

### **4.2 Caracterização do sistema de congelamento**

Esse experimento foi feito para observar a temperaturas do congelador em relação a temperatura ambiente e o registro das temperaturas do freezer durante o congelamento e do sistema de isolamento usado para o congelamento dos géis.

O registro das temperaturas foi feito através da utilização de indicador de temperatura nas amostras em teste, na caixa de isopor e congelador. As temperaturas indicadas foram registradas pelo aplicativo *LapseIt*, com o registro de uma imagem a cada dois minutos, possibilitando a posterior análise das temperaturas obtidas.

### **4.3 Caracterização das etapas de congelamento dos géis**

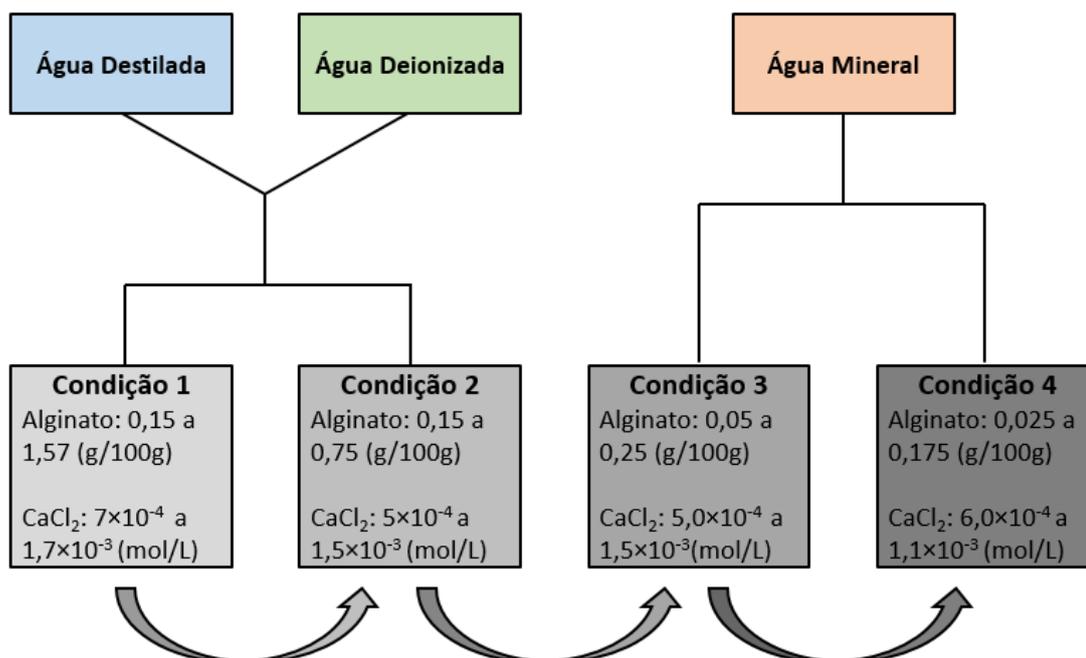
O objetivo do experimento foi observar o tempo em que ocorre o congelamento das amostras das formulações de congelamento e da água mineral e quais eventos ocorrem no processo de congelamento, para isso foram determinados tempos e temperaturas para a abertura das amostras. Amostras da formulação e de água mineral foram colocadas em microtubos e congeladas, o teste foi feito em duplicata e o registro das temperaturas foi feito do mesmo modo usado no experimento de caracterização do sistema de congelamento.

O aspecto das amostras em cada abertura foi registrado através de fotografia digital.

### **4.4 Exploração de parâmetros experimentais para formulação com formação de gel**

Determinar quais seriam as melhores concentrações a serem utilizadas na produção dos géis por congelamento foi uma das necessidades do trabalho, para selecionar onde haveria menor quantidade necessária de solutos para evitar a reticulação e promover a formação de gel após o congelamento. Para as primeiras condições de teste (Figura 10) foram utilizadas água destilada e deionizada, para analisar se os diferentes graus de pureza mostravam alterações nas formulações testadas.

**Figura 10. Condições e concentrações dos primeiros testes de análise das melhores formulações para produção de géis por alginato de cálcio por congelamento com a utilização de água mineral**



Para a determinação de nova faixa de concentrações para teste, foi selecionado os melhores resultados, feitos através do aspecto visual dos géis em relação a tamanho e resistência, assim houve a possibilidade de refinar os resultados, permitindo a utilização de novas concentrações e determinar quais as formulações exibem géis com melhor aspecto visual.

Devido a problemas na reprodutibilidade dos experimentos, durante o andamento da pesquisa passou a ser utilizada a água mineral Lindoya e Crystal (Composição mineral em Tabela 6 – Apêndice A) como solvente. Nas condições testadas após o uso da água mineral, com o objetivo de determinar a melhor formulação não apenas pelo visual, mas também pelo rendimento mássico da formulação e observar a relação entre aspecto e rendimento dos géis, foi realizada a pesagem dos géis molhados e após secagem em estufa a 60°C por 24h e então calculadas as médias de massa molhada e seca. Todas as varreduras foram congeladas em congelador doméstico dentro de uma caixa de isopor, em microtubos de 2 mL (Eppendorfs), sendo adicionados 1500 µL de solução de alginato de sódio e 500 µL de solução de cloreto de cálcio para cada microtubo.

## **4.5 Secagem dos géis produzidos por congelamento**

### **4.5.1 Liofilização**

A liofilização de algumas amostras dos géis feitos em congelador doméstico foi feita a pelo equipamento da marca Liotop, modelo Liofilizador K105, nas condições de  $-100^{\circ}\text{C}$ , à vácuo, por 24 horas.

### **4.5.2 Secagem do gel com solventes apolares**

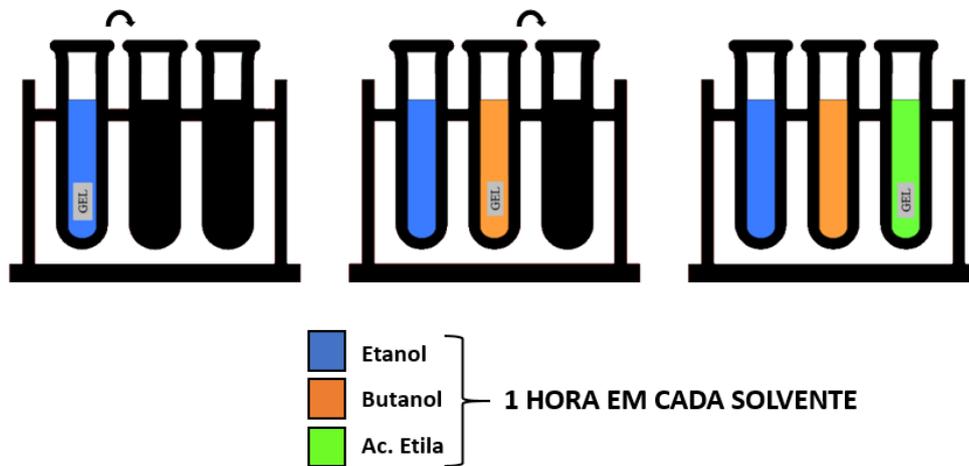
Os géis prontos foram secos através da utilização de solventes apolares. O experimento foi realizado em triplicata e teve como objetivo além de secar, manter a integridade do gel e retirar a necessidade da etapa de liofilização necessária na técnica de *ice template*.

#### **4.5.2.1 Secagem com solventes de polaridade decrescente**

A ideia da retirada de água por método líquido-líquido é utilizada para extração de solventes. Essa extração ocorre por efeito iônico, tempo de contato e a polaridade dos solventes utilizados (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007) e através dessa ideia, foram escolhidos solventes com diferença de polaridade, sendo adicionados em ordem decrescente de polaridade em relação à água, permitindo que um solvente fosse retirado pelo outro, até que por fim o último é removido por volatilização, evitando assim o colapso dos géis produzidos.

Os géis de alginato de cálcio recém-formados foram colocados em contato com etanol, butanol e acetato de etila, nessa ordem, por conta das diferentes polaridades (Figura 11). As amostras foram mantidas em cada solvente por aproximadamente 1h e então secas em estufa, temperatura ambiente e dessecador, para determinar qual o melhor método para secagem onde houvesse a melhor integridade do gel.

Figura 11. Esquema da secagem dos géis por polaridade decrescente utilizando etanol, butanol e acetato de etila

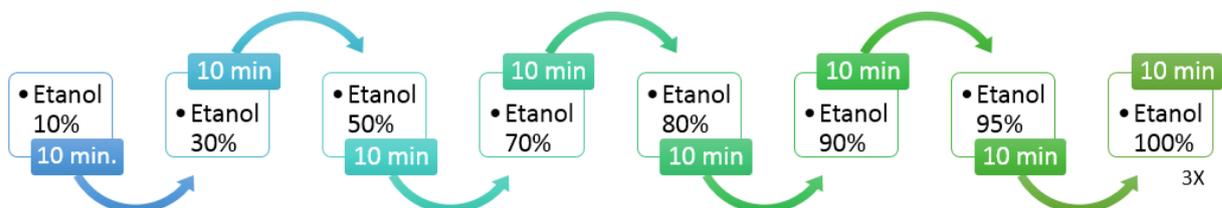


#### 4.5.2.2 Secagem com etanol

Devido a dificuldades relacionadas ao butanol, como irritações respiratórias causadas pela exposição aos vapores do solvente (KRISTIANSEN; VINGGAARD, NIELSEN, 1988), foi testada a secagem dos géis pelo método de desidratação com etanol, utilizado no protocolo desenvolvido por Luchetti (2017) do Laboratório de Helminologia Evolutiva da USP, na preparação de espécimes para microscopia eletrônica de varredura.

O método consiste na desidratação progressiva até etanol 100% (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) por 10 minutos cada (Figura 12), trocando o álcool 100% três vezes. A retirada do álcool presente no gel foi feita por volatilização em dessecador com sílica gel.

Figura 12. Método de secagem utilizado para retirada de água dos géis através da utilização de concentrações crescentes de etanol



#### 4.6 Produção de compósitos de café com alginato de cálcio

Durante os experimentos para manter a estrutura do gel formado, foi feito o experimento com a reutilização da borra de cápsulas de café do tipo “espresso” da Marca Nescafé Dolce Gusto, com o objetivo de fortalecer a estrutura e possibilitar o manuseio dos géis produzidos.

Após a coleta do pó, foi feita a lavagem e posterior secagem em estufa a 90° C por aproximadamente 2 horas. Para separar diferentes granulometrias foi feita uma decantação fracionada que separou os grãos por densidade em tempos de 1, 2 e 3 minutos. Posteriormente a decantação, foi feita mais uma secagem em estufa a 90° C por 2 horas.

Para a produção dos géis foram adicionados 0,04 g de pó, coletados na decantação de 3 minutos, para cada 2 mL da formulação de congelamento, congeladas por aproximadamente 20h em caixa de isopor e então descongeladas e secas a 60°C em estufa por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata e registrados por fotografia digital.

#### **4.7 Formação de gel após permeação em materiais porosos**

O experimento de produção de géis dentro de materiais porosos, foi feito com o objetivo de mostrar a possibilidade de manipular os poros de uma estrutura pronta. Para esse experimento inicialmente foi utilizada espuma (esponja de cozinha, de poliuretano). A formulação selecionada foi corada com azul de metileno, buscando facilitar a visualização do gel formado dentro dos materiais em teste.

Pedaços de espuma em tamanho 1×1 cm foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada em água destilada e secos em estufa a 60°C por 24h. Após o processo de lavagem foram banhados na formulação corada por 5 minutos e congelados por aproximadamente 20h, estando as amostras dentro de caixas de isopor para isolar o sistema e permitir o congelamento lento.

As amostras foram então descongeladas e novamente lavadas 3 vezes, por 5 minutos cada em água destilada, submetidas a secagem por solvente apolares e secas em estufa a 60°C por 24h.

Amostras de cerâmica (vela de filtro) também foram utilizadas para o experimento seguindo o mesmo procedimento das amostras de espumas.

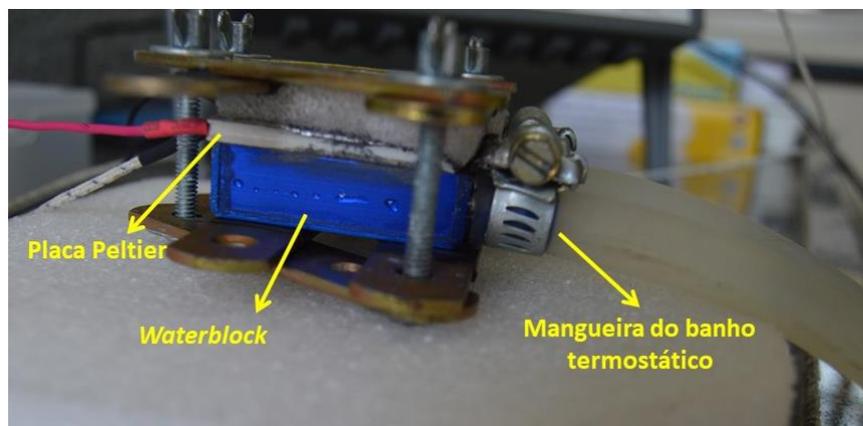
Após a secagem todas as amostras foram analisadas em microscopia ótica para observar a formação de gel no interior dos materiais testados, foram analisadas amostras materiais sem nenhuma adição de soluções, materiais com adição de alginato de sódio com e sem a etapa de congelamento e materiais com adição da formulação selecionada com e sem a etapa de congelamento

#### 4.8 Gel unidirecional

Poros unidirecionados são uma das características únicas provenientes de sistemas convencionais de *ice-template*, o que pode ser obtido pelo controle da direção de congelamento do sistema (DEVILLE, 2010). Partindo desse princípio foi realizado um experimento de géis unidirecionados de alginato de cálcio a partir de um sistema montado em laboratório.

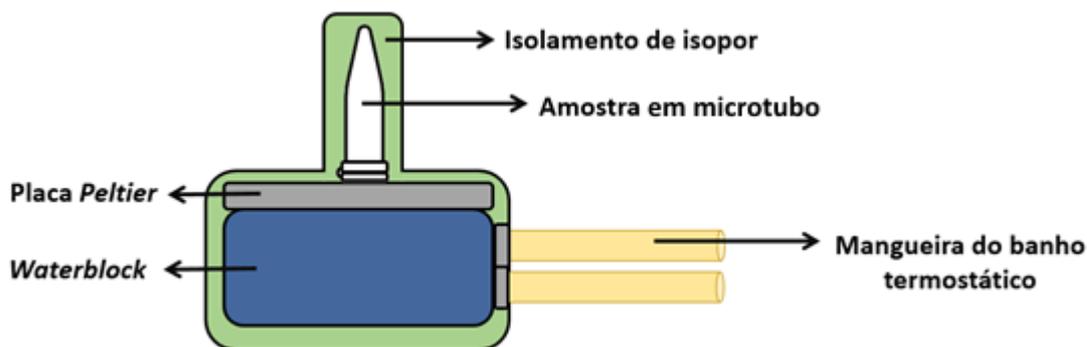
O experimento foi feito em colaboração ao projeto de Iniciação Científica do aluno Emerson Teixeira Tsukada. O objetivo desse experimento foi mostrar a possibilidade de realizar o congelamento direcionado sem a utilização do equipamento de dedo frio. O sistema de congelamento utilizado para o experimento é composto por três partes principais, sendo elas: uma placa *Peltier*, um dissipador de calor (chamado também de *waterblock*) e o banho termostático (Figura 13). O sistema *Peltier* sob alimentação elétrica, gera aquecimento em uma das superfícies da placa e resfriamento na superfície oposta. O equipamento de *waterblock*, junto ao banho termostático tem como função dissipar o calor produzido pela superfície da placa na qual ocorre o aquecimento, impedindo o superaquecimento da placa *Peltier*.

**Figura 13. Sistema composto por placa *Peltier* e *waterblock* e banho termostático**



Para um processo mais eficiente e redução da intensidade da troca de calor entre o sistema de congelamento e o ambiente, foi utilizado um revestimento de isopor (Figura 14). Esse revestimento recobriu a porção composta pelo dissipador de calor, pela placa *Peltier* e pela superfície de resfriamento (onde a amostra foi posicionada).

**Figura 14. Revestimento de isopor utilizado para diminuir a intensidade da troca de calor entre o sistema e o ambiente.**



Foram congeladas amostras da formulação por um período de aproximadamente 1h30. O gel formado foi liofilizado pelo período de 24h e então observado por microscopia ótica e fotografia digital.

## 5 Métodos de análises e caracterização visual

### 5.1 Fotografia digital

O registo do aspecto visual dos géis feitos em congelador doméstico foi feito a partir de fotografias digitais realizadas por equipamento fotográfico da marca Nikon Corporation, modelo NikonD3200.

### 5.2 Microscopia ótica

A caracterização morfológica foi feita por meio de microscopia ótica pelo microscópio Leica, modelo DM 2700 M e DM 2700 P. As análises foram realizadas no microscópio do Laboratório de Biomassa e Bioenergia localizado na UFSCar *campus* Sorocaba, SP.

### 5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica também foi feita através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram recobertas com filme de ouro, por conta da natureza orgânica do material. As análises foram realizadas no microscópio Quanta, modelo 650 FEG e no microscópio *Inspect* modelo F50, no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) localizados no CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) em Campinas, SP.

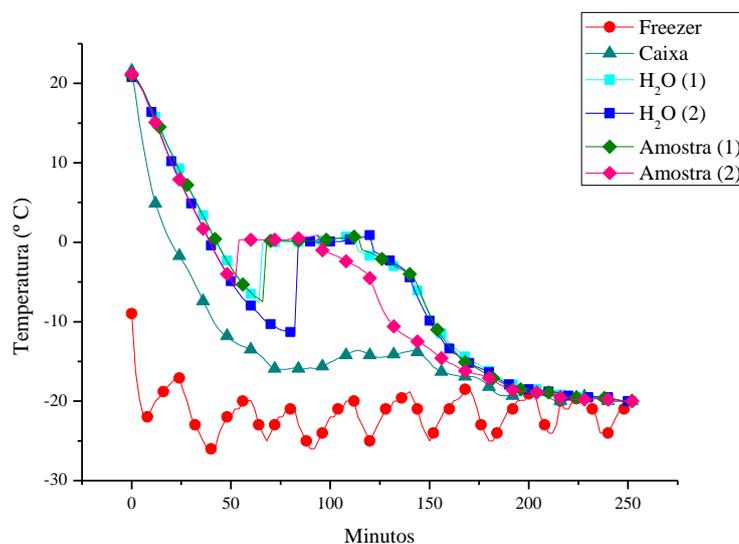
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização do sistema de congelamento

Para o congelamento utilizamos uma geladeira doméstica no laboratório e reservamos o congelador exclusivamente para os experimentos de *ice template*. Para que pudéssemos conhecer como o congelador funcionava e usá-lo como reator para os processos de *ice template*, acompanhamos o seu funcionamento com sensores de temperatura.

No congelador doméstico, o equilíbrio de temperatura em todas as amostras, caixa e freezer, ocorreu após 250 minutos (Gráfico 1). O equilíbrio foi considerado o tempo no qual as amostras atingiram na mesma temperatura. Observou-se que o freezer apresenta ciclos de temperatura de aproximadamente 30 minutos, oscilando entre -17 e -26°C. Esta oscilação não acontece dentro da caixa de isolamento térmico, possivelmente pela histerese proporcionada pelo isolamento térmico.

**Gráfico 1. Temperaturas observadas no sistema após 250 minutos do processo de congelamento**

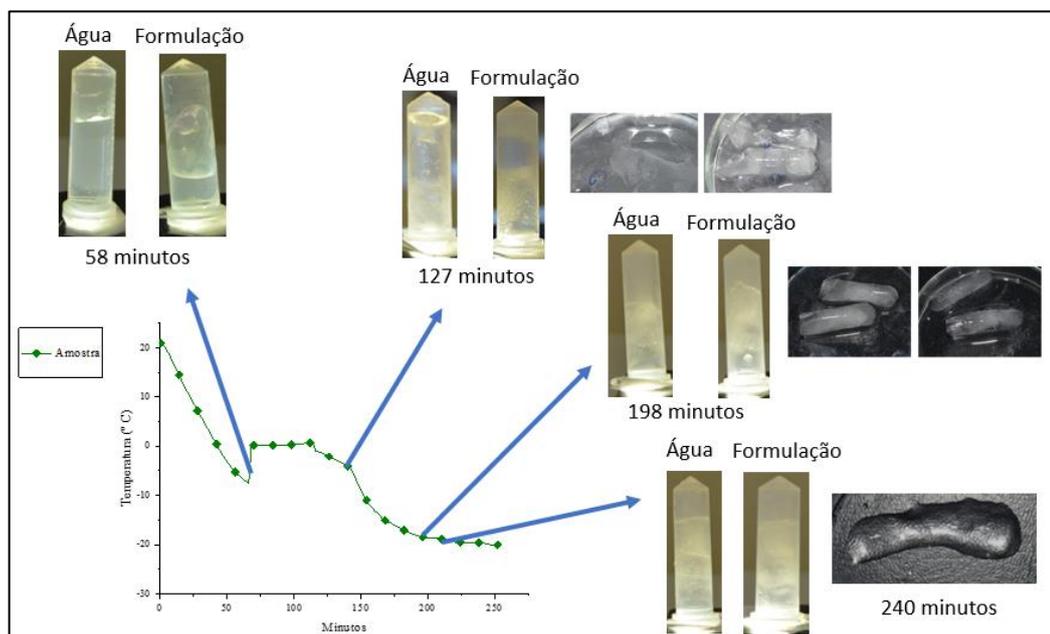


As amostras da formulação e de água, que foi utilizada como método de comparação, apresentaram os mesmos fenômenos exotérmicos, porém em temperaturas diferentes, mostrando a dispersão natural do sistema. O fenômeno exotérmico foi atribuído ao congelamento da água, por conta da liberação de energia que ocorre na difusão das moléculas para a fase sólida, emitindo calor latente.

## 6.2 Caracterização das etapas de congelamento dos géis

Após a análise da caracterização do sistema, foi realizada a caracterização dos géis de acordo com os eventos observados nos gráficos de temperatura obtidos na seção anterior. O objetivo foi observar em que período ocorre o total congelamento das amostras e a formação de gel nas amostras da formulação. A ocorrência dos fenômenos foi feita acompanhando-se a temperatura (Figura 15).

**Figura 15. Registro das temperaturas das amostras em teste com processo interrompido em tempos de 58 minutos, 127 minutos, 198 minutos e 240 minutos de processo de congelamento**



A primeira abertura do sistema foi realizada após aproximadamente 58 minutos de congelamento, sendo que as amostras chegaram a temperatura de 0°C por volta de 45 minutos para as formulações e 55 minutos para as amostras de água. As amostras de água e formulação quando retiradas do congelador ainda não apresentavam aspecto de congelamento, assim como esperado, já que o processo de formação inicial de gelo exibe um evento exotérmico que não ocorre quando a temperatura atinge exatos 0°C, porém a formulação apresentou maior viscosidade em relação ao início do congelamento, o que ocorre também para as formulações de água em temperaturas mais baixas (LIKHACHEV, 2003). A maior percepção de viscosidade das formulações pode ser explicada pelo envolvimento de atividade intermolecular dos solutos, com o aumento da concentração de sólidos, que é maior do que o contido em apenas água, a ligação dos grupos do soluto com o hidrogênio gera o aumento da viscosidade e baixas temperaturas tendem a fortalecer as ligações (KAR; ARSLAN, 1999), aumentando a viscosidade nas amostras.

A segunda abertura do sistema foi feita após 127 minutos, nessa etapa as amostras atingiram a temperatura de 0°C após 75 minutos as diferenças entre os sistemas podem ser referentes as oscilações do congelador, que altera em alguns minutos a diferença entre as diferentes aberturas de sistema. Após 100 minutos algumas amostras ainda estavam em 0°C, para que o congelamento fosse interrompido foi aguardado até que todas as amostras saíssem de 0°C, mas nesse tempo a formulação 2 indicava a temperatura de -3°C. Quando o sistema foi aberto, a formulação 1 estava em -0,3°C. As amostras de água apresentaram sinais de início de congelamento, com formação de poucos cristais nas paredes do recipiente, mas descongelavam após pouquíssimo tempo em temperatura ambiente e as amostras de formulação apresentaram os mesmos sinais, indicando o início do congelamento no mesmo período.

Foi possível observar diferentes fases nas formulações, sendo o congelamento de forma multidirecional e sabendo que vários núcleos de gelo são formados durante o processo de congelamento, supõe-se que fases de diferentes opacidades seriam nucleações resultantes do começo do processo de cristalização da água. Após serem retiradas do microtubo, as amostras de formulação se mantiveram melhor que as de água mineral, porém com o descongelamento rápido houve apenas formação de grumos e não estrutura de gel. Os grumos se formam pois com o início do congelamento há o aumento da concentração de solutos, gerando o início da reticulação, mas a concentração ainda é baixa para a formação do gel polimérico.

A terceira abertura foi feita após aproximadamente 198 minutos de congelamento, nessa etapa as amostras atingiram a temperatura de 0°C por volta de 70 minutos de congelamento. Após 160 minutos de processo uma das amostras de água ainda estava em 0,4°C, enquanto as outras já apresentavam queda de temperatura. As amostras quando retiradas do sistema apresentaram aspecto de “quase congeladas”, mas ainda havia resquício de água para completar o processo. As amostras de formulação apresentaram as mesmas características da amostra de água, ainda precisando de mais tempo de congelamento para finalizar todo o processo. Após a retirada dos tubos, a formulação ainda se mantém congelada por mais tempo que as amostras de água, mas ainda há a necessidade de completar o processo de congelamento para a formação de gel das amostras.

A última abertura do sistema foi feita aos 200 minutos de congelamento, onde as amostras já estavam congeladas e a formulação apresentou formação de gel, nessa etapa, as amostras de água e formulação já haviam alcançado equilíbrio de temperatura, quando retiradas do microtubo estavam completamente congeladas e houve a formação de gel.

Foi determinado que o tempo necessário para o congelamento com a formação de gel em congelador doméstico, é de aproximadamente 200 minutos, ou seja, 4 horas. Durante o experimento, foi possível observar que o fenômeno exotérmico é

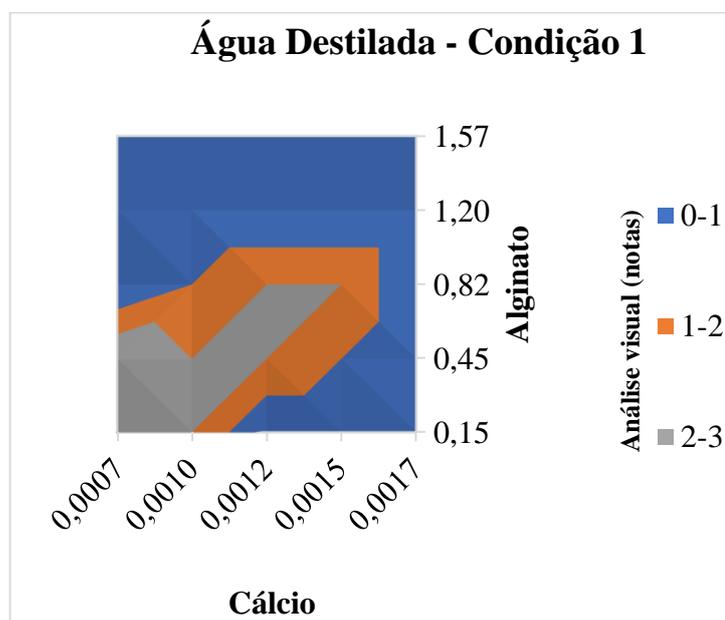
rente ao congelamento da água, e não à formação de gel, que não pode ser observada através da variação das temperaturas do sistema de congelamento, assim como foi atribuído durante a primeira análise das temperaturas.

### 6.3 Exploração de parâmetros experimentais para formulação com formação de gel

#### 6.3.1 Exploração de parâmetros utilizando água destilada

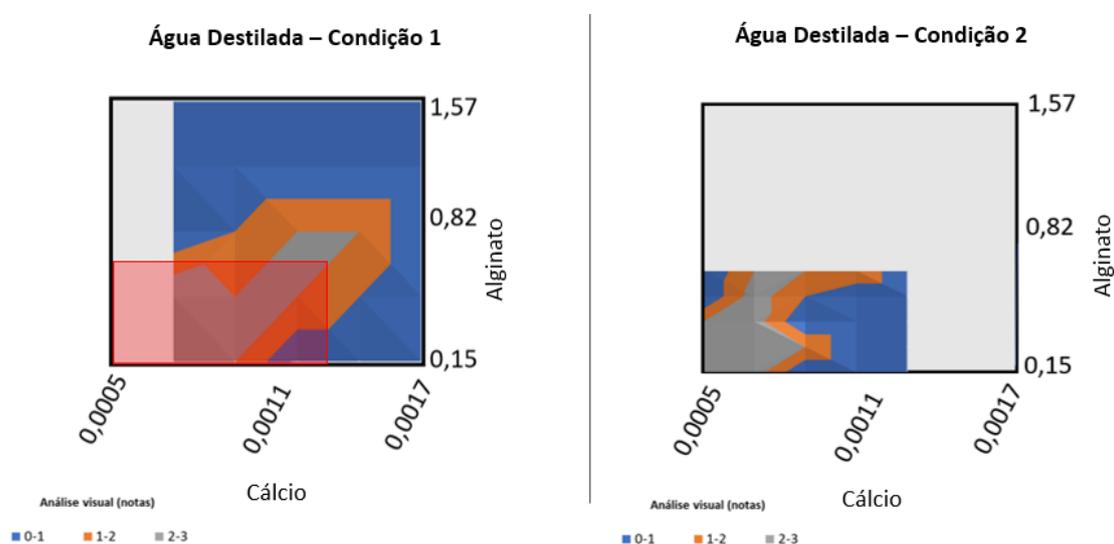
Após o descongelamento das amostras, foi analisado o aspecto visual dos géis formados através de um ranking de notas (Gráfico 2), as cores do gráfico indicam a qualidade dos géis formados, sendo que géis classificados com nota 0 e 1 durante a análise visual estão representados pela cor azul e foram descartados do trabalho já que gelificaram antes do congelamento. Esse fenômeno ocorreu nas maiores concentrações de  $\text{CaCl}_2$  e maior concentração de alginato de sódio, podendo ser ocasionado pela quantidade de monômeros disponíveis para a gelificação. Quando há maior disponibilidade de monômeros, há a reticulação imediata com os íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , causando gelificação instantânea.

Gráfico 2. Gráfico de contorno que apresenta as formulações analisadas na varredura 1, com o uso de água destilada



Os géis de nota 2, que são intermediários, estão indicados pela cor laranja e os de nota 3, pela cor cinza. Os géis de nota 3 formaram as estruturas consideradas como melhores, indicando que nessas formulações as proporções de monômeros para íons de  $\text{Ca}^{2+}$  seriam suficientes para evitar uma reticulação imediata, mas exibir formação de gel após o aumento da concentração decorrente do congelamento. Para refinar o resultado apresentado, foi feita a readequação da faixa a ser testada, partindo da faixa onde a formação do gel foi satisfatória, utilizando concentrações menores de alginato de sódio e  $\text{CaCl}_2$  (Figura 16)

**Figura 16. Faixa readequada para os testes da segunda condição de formulações**

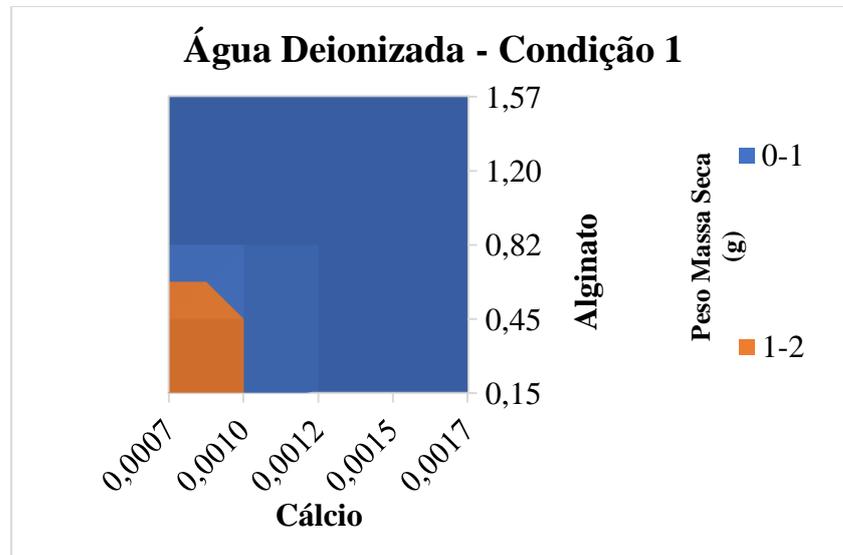


Comparando os resultados das duas condições, foi possível observar que a quantidade de géis formados e com melhor aspecto visual aumentou após a readequação e que os melhores ficaram compreendidos entre as menores combinações de  $\text{CaCl}_2$  e alginato.

### 6.3.2 Exploração de parâmetros utilizando água deionizada

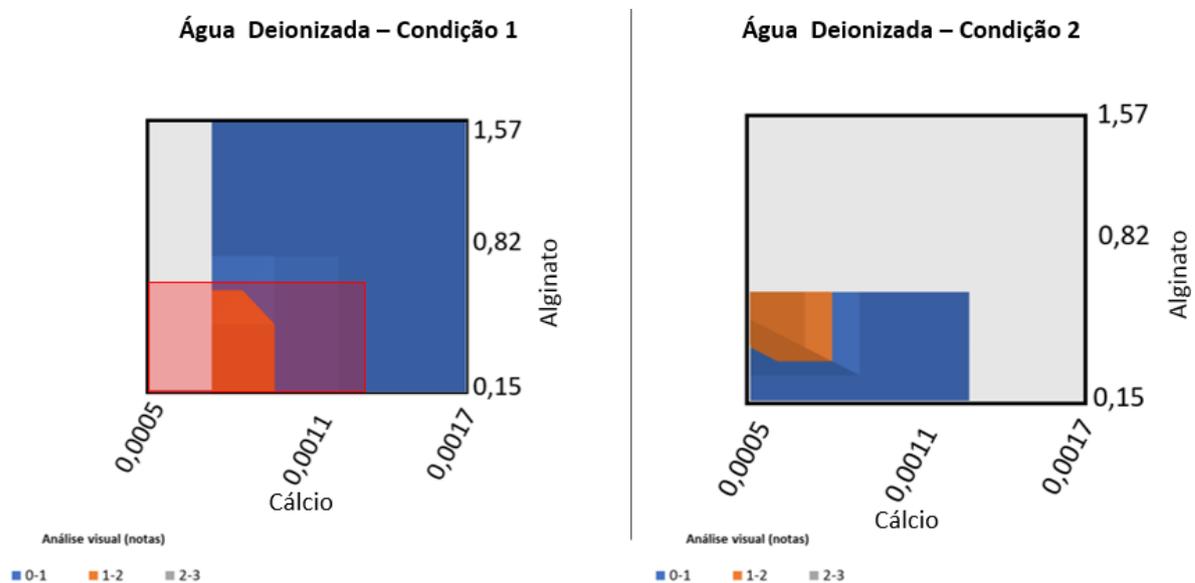
O mesmo experimento foi realizado com a água deionizada, que mostrou resultado diferente do uso da água destilada (Gráfico 3). Quase todas as formulações gelificaram logo no preparo, mas as formulações onde não houve reticulação imediata, sendo essas as de menores concentração de  $\text{CaCl}_2$ , apresentaram formação de gel após o congelamento. Uma das hipóteses iniciais para explicar a diferença entre água destilada e deionizada é que haveria influência da força iônica da água no processo de gelificação do alginato, porém o resultado foi o oposto do esperado, com a água mais pura apresentando maior faixa de concentrações em que ocorre a gelificação antes do congelamento.

**Gráfico 3. Gráfico de contorno que apresenta as notas dadas nas formulações analisadas na varredura 1**



Na primeira condição de teste, os géis classificados como nota 1 e 2 mostraram formação de géis com bom aspecto visual, estando na faixa de concentrações mais baixas de  $\text{CaCl}_2$  combinadas com concentrações baixas de alginato, assim como na água destilada. (Figura 17)

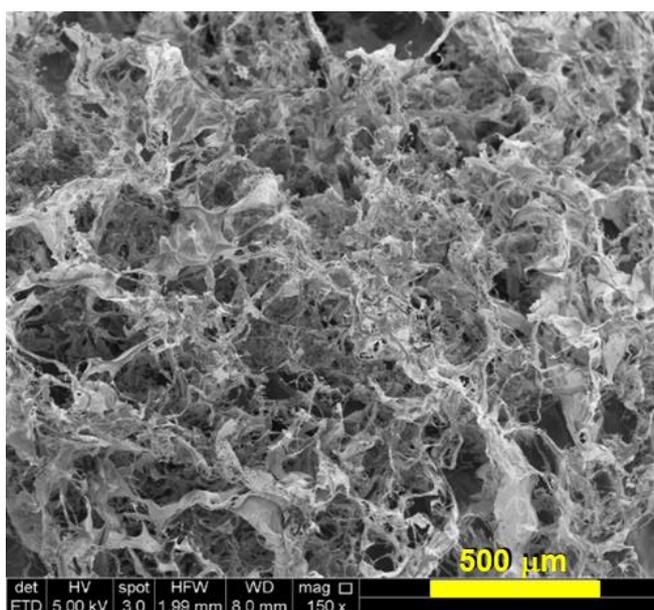
**Figura 17. Faixa readequada para os testes da segunda condição de formulações**



Na segunda condição, após a readequação das faixas de concentração, feitas do mesmo modo que a exploração das formulações com água destilada, os eventos de reticulação antes do congelamento das formulações também ocorreram em grande quantidade e concentrações mais baixas de alginato, onde anteriormente as estruturas porosas foram produzidas, não apresentou nenhum gel formado. Analisando o resultado das varreduras feitas com os dois tipos diferentes

de água, foi determinado que a formulação de 0,15 g/100g combinada a 0,0010 mol/L de  $\text{CaCl}_2$  seria escolhida para a formação de gel, por apresentar estrutura em todas as amostras da triplicata nas duas condições, independente do solvente usado. A partir dessa concentração, um dos géis formados foi liofilizado e observado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 18).

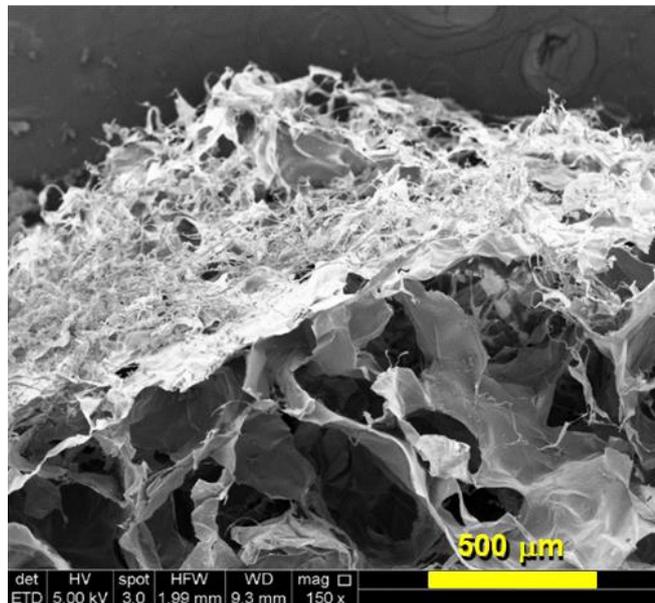
**Figura 18. Poros da superfície do gel formado por congelamento e liofilizado, em magnificação de 150x**



A Figura 18, de magnificação de 150x, mostra a superfície do gel, de característica porosa na superfície e com aspecto esponjoso com muitos filamentos. É possível observar que os poros não seguem uma única direção, mostrando que o congelamento feito em congelador doméstico forma cristais multidirecionais ocasionando poros com a mesma característica.

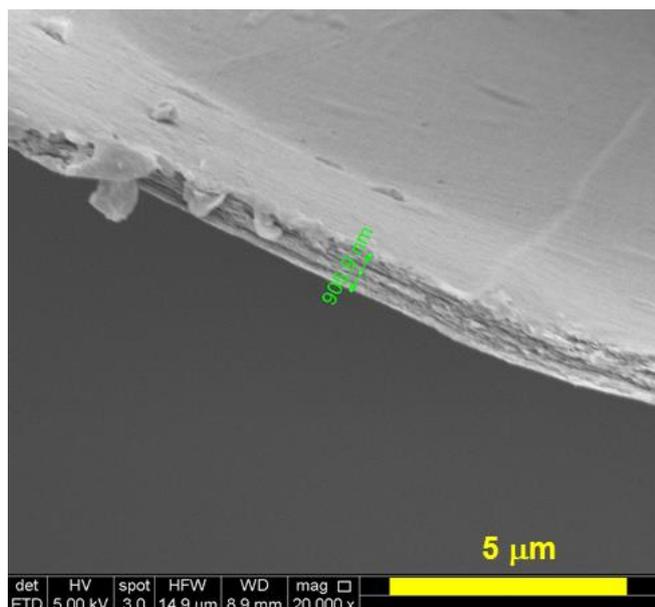
A Figura 19, feita após um corte transversal, também em magnificação de 150x, permite observar as diferenças entre a superfície e o interior do material, que apresenta poros maiores e paredes mais definidas, que pode ser ocasionada pela diferença entre o início e a continuação da precipitação do soluto, que causa o aumento progressivo da concentração.

**Figura 19. Corte transversal do gel formado por congelamento, possibilitando a visualização da diferença morfológica entre a superfície e o interior da estrutura, magnificação de 150x**



Utilizando uma magnificação de 20.000x foi possível medir a espessura das paredes dos poros do interior do gel (Figura 20), que tem aproximadamente 900nm de espessura, e que aparenta ser formada em camadas, característica da reticulação do alginato após a ligação entre as fitas formadas no início da reticulação, que confere uma estrutura mais firme ao gel após as ligações entre as fitas, formando camadas de alginato.

**Figura 20. Espessura da parede do gel produzido por congelamento, com aproximadamente 900nm e magnificação de 20.000x**



## 6.4 Uso de água mineral como solvente

O uso da água destilada dificultou a reprodutibilidade dos experimentos, dependendo do período em que era utilizada. Isso se deve ao fato de a água destilada do laboratório de ensino exibir qualidade variável, provavelmente por não ser possível o controle das variáveis de processo, além do armazenamento que possibilitava a evaporação de água, influenciando na concentração das impurezas em função do tempo de armazenamento. O uso da água deionizada foi impossibilitado pela dificuldade de acesso.

Usar a água corrente do *campus* também não era adequado devido à sua alta dureza ( $\sim 70$  mg/L)<sup>1</sup>, interferindo no processo de gelificação dos ensaios realizados, com muitas variações em seus resultados, dificultando também o processo de reprodutibilidade do experimento.

Para resolver os problemas relacionados à reprodutibilidade optou-se pelo uso da água mineral Lindoya e Crystal (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** e **Erro! Fonte de referência não encontrada.** – APÊNDICE - A). O uso de água mineral no lugar da água destilada aproxima o processo da condição de viabilidade econômica, devido ao seu menor custo. A escolha da água foi determinada pela menor quantidade de cálcio disponível na água, em comparação as outras marcas disponíveis. Resultados anteriores apontaram para uma maior reprodutibilidade nesta linha de pesquisa e nas demais do grupo de pesquisa que usam o alginato, após o uso da água mineral.

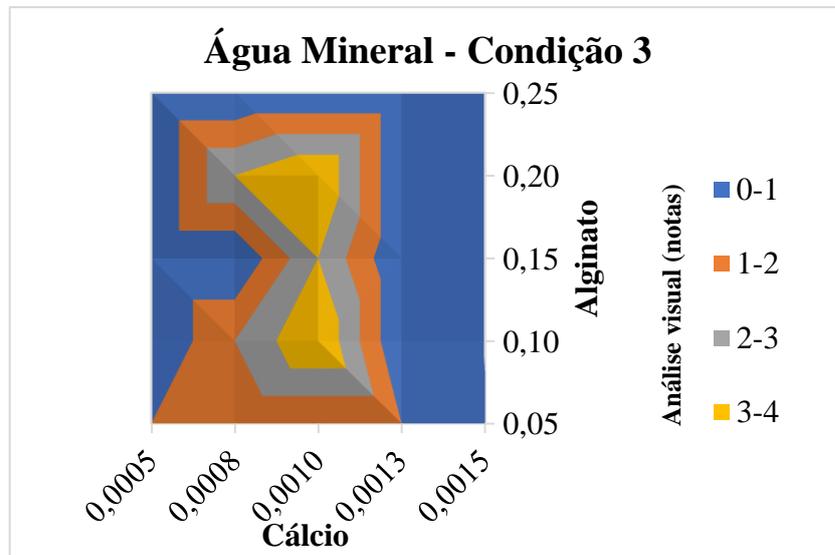
### 6.4.1 Exploração de parâmetros utilizando água mineral

Por conta do adicional de cálcio, mesmo que pequeno, contido na composição da água mineral, foi determinada uma nova faixa de gelificação. Novamente as maiores concentrações de  $\text{CaCl}_2$ , gelificaram antes do congelamento, exceto pelas formulações com menor concentração de alginato, assim como nas explorações anteriores, pela pequena quantidade de unidades de  $\text{CaCl}_2$  para promover a reticulação do alginato, não sendo suficiente para a formação de estrutura após o congelamento das amostras. Os resultados referentes aos testes com uso de água mineral e em novas condições de concentração podem ser observados no Gráfico 4.

---

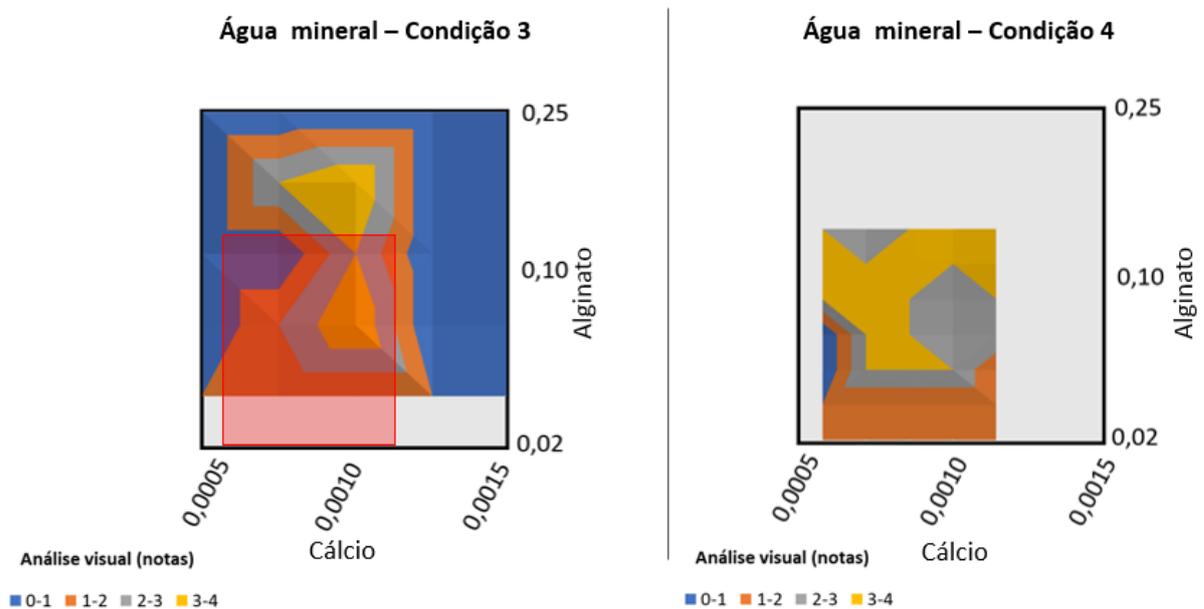
<sup>1</sup> Resultado obtido em experimentos do Laboratório da disciplina de Introdução à Química Ambiental, realizado em 04/05/2017.

Gráfico 4. Gráfico de contorno que apresenta as notas dadas nas formulações analisadas na condição 3



A coloração amarela do gráfico, que representa os géis de nota 4, que foram os que apresentaram os géis de melhor aspecto visual e foram formados nas formulações de 0,20 g/100g e 0,10 g/100g de alginato com 0,0010 mol/L de  $\text{CaCl}_2$ . Os resultados foram refinados em mais uma readequação de concentrações, para encontrar a melhor formação visual de gel (Figura 21)

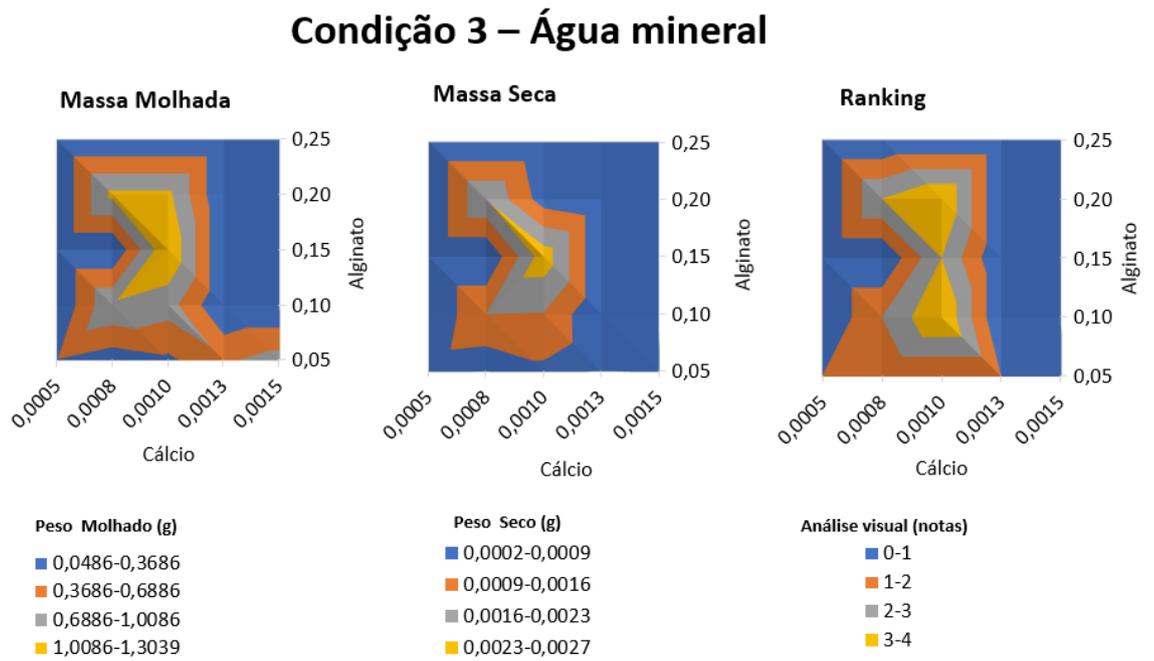
Figura 21. Faixa readequada para os testes da terceira condição de formulações



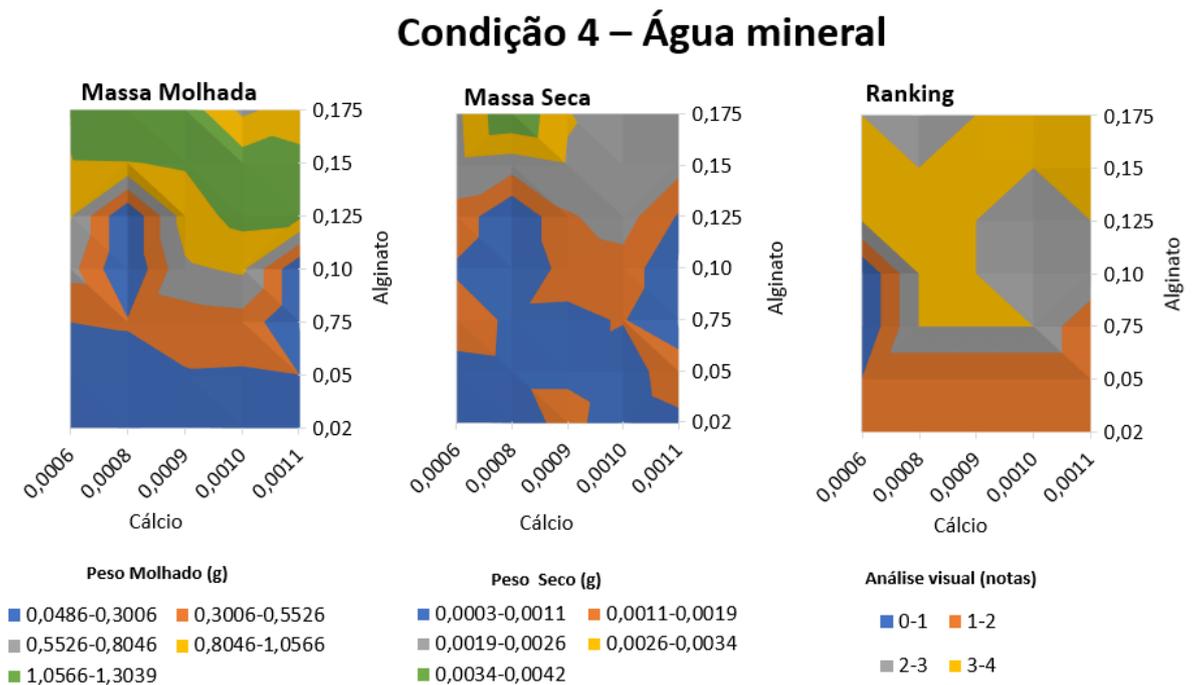
A partir dessa análise exploratória os géis formados passaram a ser pesados e então calculadas as médias dos pesos secos e molhados, a fim de relacionar o aspecto visual com o

rendimento dos géis, e o mesmo foi feito após a readequação das faixas de formulações em teste (Figura 22e Figura 23)

**Figura 22. Gráficos de contorno de massa seca, massa molhada e dos rankings, para mostrar a diferença entre aspecto visual e rendimento mássico dos géis formados na condição 3**



**Figura 23. Gráficos de contorno de massa seca, massa molhada e dos rankings, para mostrar a diferença entre aspecto visual e rendimento mássico dos géis formados na condição 4**



Os géis com maiores massas antes do processo de secagem, seguiram o mesmo padrão dos géis com melhores aspectos visuais, o que sugere uma importância no equilíbrio entre as concentrações de alginato e  $\text{CaCl}_2$ , indicando que quando há muita diferença entre as concentrações não há um rendimento mássico satisfatório.

Após a secagem dos géis, os géis com maior massa, as cores cinza e amarela ficaram nas formulações intermediárias, assim como os de maior massa molhada, porém nas combinações com concentrações mais baixas a massa diminuiu bastante, como o alginato é composto por muita água, supõe-se que a maior parte do peso desses géis foi relativa à quantidade de água e não de solutos presentes, portanto durante a etapa de secagem, com a perda de água, a massa do soluto se mostrou coerente à quantidade presente nessas formulações.

Ao fim da análise dos resultados é possível dizer que as formulações com melhor aspecto visual estão entre as formulações de 0,10 e 0,20 g/100g de alginato quando combinadas a 0,0010 mol/L de  $\text{CaCl}_2$ , porém nenhuma dessas formulações apresentaram o melhor rendimento quando comparadas ao peso dos géis formados.

A formulação com melhor rendimento de massa, após a etapa de secagem, foi a de 0,15 g/100g de alginato junto à 0,0010 mol/L de  $\text{CaCl}_2$ , que no aspecto visual foi classificado como um gel de nota 3, gel grande e com pouca firmeza.

A partir dos resultados dessa varredura, é possível dizer que as formulações de 0,15 g/100g e 0,175 g/100g de alginato junto a 0,0010 mol/L de  $\text{CaCl}_2$ , podem ser consideradas com faixas ótimas de gelificação para a produção de géis por congelamento, como a formulação que se apresentou como de maior rendimento nas duas varreduras foi a de 0,15 g/100g junto a 0,0010 mol/L de  $\text{CaCl}_2$ , para todos os seguintes testes essa foi utilizada como a formulação determinada para o uso no trabalho.

## 6.5 Secagem do gel com solventes apolares

As primeiras tentativas de secagem dos géis foram feitas em estufa, dessecador sob vácuo, e em exposição ao ambiente. Após o processo os géis preparados foram analisados visualmente, porém a estrutura do gel colapsou com a retirada de água. Como alternativa de enrijecimento da estrutura para possibilitar a secagem sem colapso em uma das tentativas foi adicionada solução de  $\text{CaCl}_2$  1M, mas o excesso de cálcio gerou uma estrutura colapsada e quebradiça (Figura 24 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

**Figura 24. Gel reforçado com solução concentrada de  $\text{CaCl}_2$  seco a temperatura ambiente (esquerda) e estufa (direita).**



Como tentativa de preservação dos poros formados, sem ter de usar a liofilização, o que diminuiria a acessibilidade à técnica desenvolvida nesta dissertação, testamos uma etapa de retirada de água com o uso de solventes apolares, para garantir a reticulação do gel pela presença de solventes com maior pressão de vapor que a água, garantindo uma secagem mais rápida. A ideia central do experimento foi a retirada de água através do etanol, do etanol através do butanol e do butanol através do acetato de etila, proporcionando um aumento gradual de polaridade, seguido de secagem em estufa a  $60^\circ\text{C}$ , dessecador sob vácuo, e ambiente.

Apenas as amostras secas em dessecador e butanol mantiveram a estrutura similar ao gel formado no congelamento (Figura 25), com estrutura mais cheia, sem nenhum colapso em suas partes, diferentes dos outros dois reagentes, isso se dá pela esterificação que ocorre nos grupos carboxil do alginato quando em contato com o butanol, que tem preferência pelos resíduos de ácido gulurônico da estrutura (BRODERICK et al., 2006). Supõe-se que por conta da melhor interação com os blocos G, já reticulados durante a formação de gel, o butanol mostrou melhor resultado por reforçar essas ligações e permitir que o gel mantivesse sua estrutura.

**Figura 25. Géis após secagem por solventes apolares e dessecador: Etanol, butanol, acetato de etila.**



Em virtude de o butanol apresentar toxicidade, e isto reduzir o leque de aplicações do material, testamos a desidratação apenas com etanol, seguindo um dos protocolos de secagem de material vegetal, o que não apresentou bom resultado em relação a retirada de água, com colapso do material formado (Figura 26).

**Figura 26.** Géis colapsados após a tentativa de através da desidratação progressiva utilizando etanol.



Portanto, com o intuito de manter a integridade do material, o procedimento de gelificação por congelamento e secagem com troca de solventes até o butanol foi a alternativa mais eficiente para o procedimento desenvolvido.

## **6.6 Produção de compósitos de café com alginato de cálcio**

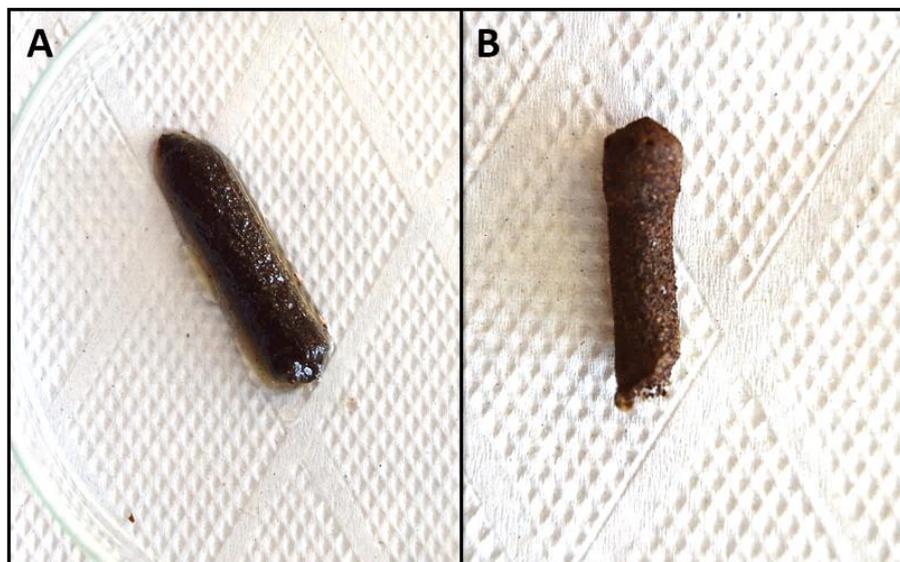
Nas alternativas de auxílio na integridade dos géis e evitar o colapso da estrutura, ocorreu a formação de compósitos e com a utilização de pó de café usado. Foi observado que todos os grãos de café, após o congelamento, ficam retidos no gel formado (Figura 27), indicando que durante a formação lenta de gelo, tanto os grãos como os solutos são arrastados, até a gelificação acontecer pelo aumento simultâneo na concentração do alginato e do  $\text{CaCl}_2$ . Isso ocorre segundo Colla; Prentice-Hernández (2003) porque durante o crescimento dos cristais de gelo, as moléculas que se agrupam aos sítios de nucleação buscam se arrastam até locais onde tenham estabilidade no seu estado de energia e as partículas de um soluto podem se difundir para o interior da parte líquida, o que sugere que as nucleações do gelo durante a produção de gel se iniciam na superfície do microtubo no início do congelamento.

**Figura 27. Compósito de café após descongelamento.**



A adição de grãos de café permitiu a retirada do compósito do microtubo e bom manuseio da estrutura sem perda de integridade e permitiu a secagem em estufa sem colapso e mantendo de forma efetiva a integridade do gel, sem a necessidade do uso da etapa de troca de solventes (Figura 28).

**Figura 28. Compósito de café após a retirada do tubo (A) mostrando que houve a integridade do gel, (B) gel após a secagem em estufa, não apresentando sinais de colapso**



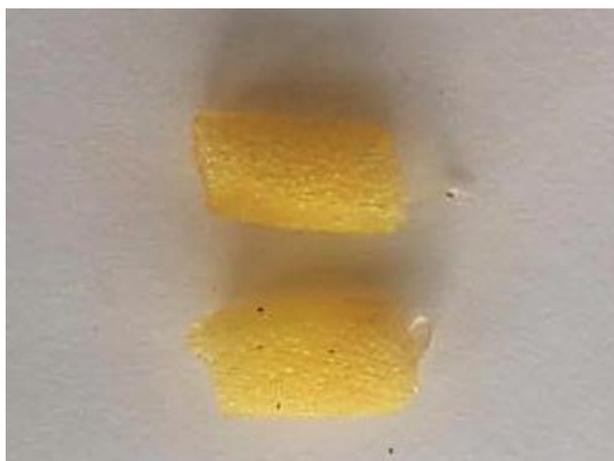
Além da integridade do gel apresentar melhora com o uso de café residual, segundo Franca, Oliveira e Ferreira (2009), os grãos de café podem ser utilizados como adsorventes na remoção de corantes, como o azul de metileno, empregado na indústria e que causa toxicidade ambiental e danos à saúde humana e animal.

O alginato também pode ser usado para fins de adsorção. Li et al (2017) utilizou membranas porosas de alginato, preparadas através de liofilização, para adsorver azul de metileno e esse mesmo estudo confirmou que altas taxas de cálcio diminuem a capacidade adsortiva do alginato. A partir dessas informações, é sensato supor que a utilização do compósito produzido nesse trabalho pode ser explorada para estudos de adsorção, visto que o gel e o compósito possuem potencial de adsorção e em conjunto poderiam aumentar o potencial de limpeza de efluentes contaminados com corantes como o azul de metileno.

### **6.7 Formação de gel após permeação em materiais porosos**

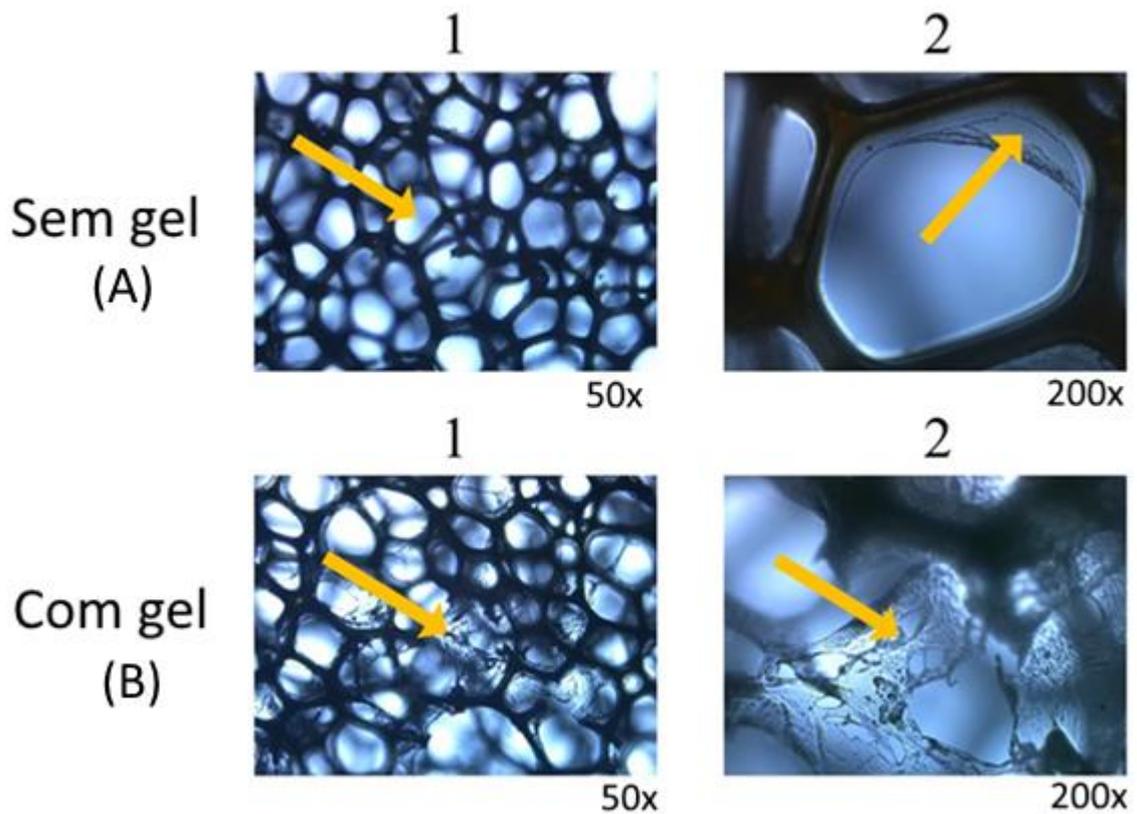
Uma das vantagens da utilização de formulações em condição de pré-reticulação para a produção de géis, proposta dessa dissertação, é a capacidade da solução de permear por um meio poroso e proporcionar a gelificação por congelamento dentro deste material. O primeiro experimento de prova de conceito deste comportamento foi feito com a inserção das espumas em um recipiente contendo a formulação selecionada, porém os géis foram formados na superfície das espumas e não em seu interior (Figura 29). Isto provavelmente ocorreu porque cada poro de uma espuma, apesar de sua interconectividade, atua como um sistema com algum isolamento térmico, havendo formação de gelo, preferencialmente, fora da espuma ou nas suas camadas superficiais.

**Figura 29. Resultado da primeira tentativa de experimento com espumas mergulhadas em formulação de congelamento**



Para os novos testes, foi feita a imersão das espumas na formulação de formação de géis, com o objetivo de congelar apenas a espuma com a formulação embebida em seu interior, forçando a gelificação dentro do meio poroso. Para facilitar a visualização do gel através da luz, a amostra foi corada com azul de metileno. Para esse experimento, após o descongelamento das amostras, as mesmas foram observadas em microscopia ótica, mas não foi realizada uma etapa de lavagem das amostras antes da secagem. Para a realização da microscopia foram analisadas amostra da espuma pura, como método de controle e das amostras imersas na formulação de congelamento (Figura 30).

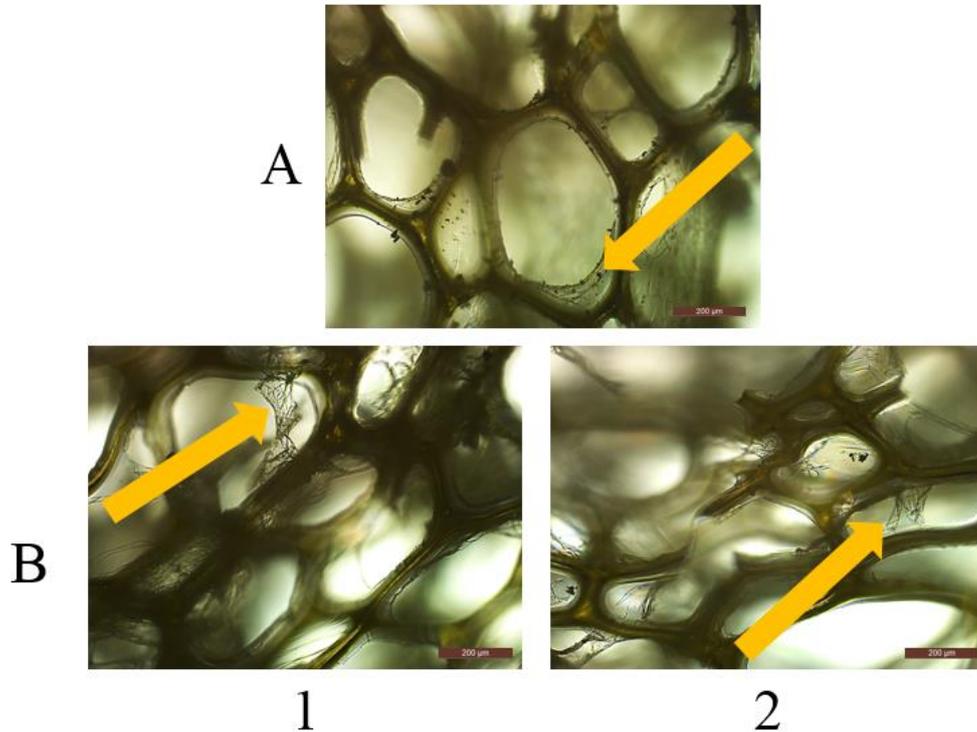
**Figura 30. Microscopia ótica das amostras de esponja. A: esponja embebida com azul de metileno, em magnificação de 50x (A-1) e 200x (A-2); B: esponja embebida com formulação de congelamento e azul de metileno em magnificação de 50x (B-1) e 200x (B-2).**



A seta na Figura 30 A-2, com magnificação de 200x, mostra que a esponja pura, utilizada como controle, apresenta fibras do próprio material e são destacadas para indicar que estruturas similares nas amostras após a adição da formulação não indicariam a formação de gel. A seta nas Figura 30 A-1 e B-1, com magnificação de 50x, mostram que há diferença na morfologia da esponja controle em relação a esponja com adição da solução de congelamento e a comparação entre as **Erro! Fonte de referência não encontrada.** A-2 e B-2, observadas na magnificação de 200x, mostra que a estrutura não é similar à encontrada na amostra pura. Essa diferença estrutural indica que houve a formação de gel dentro do material poroso, porém a evidência de formação de gel na espuma pode ser devida à precipitação do alginato da formulação durante a secagem, portanto o experimento foi repetido com lavagem em água após o congelamento para a certificação da ocorrência da gelificação no material poroso.

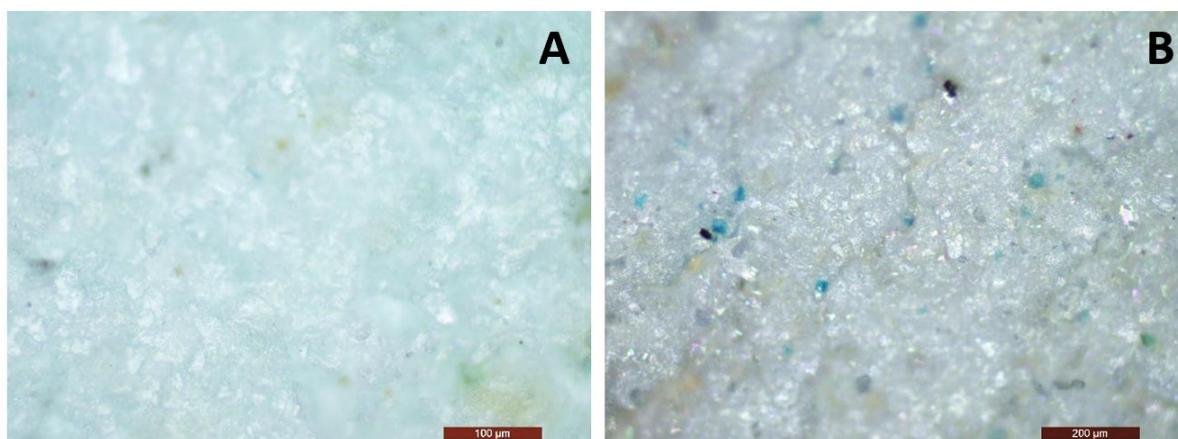
Após a etapa de lavagem das amostras contendo a formulação (Figura 31 - B1 e B2) ainda mostraram uma estrutura de teia, como indicada pelas setas entre os poros da esponja, diferente do encontrado na esponja pura, porém em menor quantidade. A presença deste tipo de estrutura, mesmo em menor quantidade após a lavagem, que retirou excessos de alginato não gelificados, pode indicar a efetividade na formação de gel após a permeação por materiais porosos através do congelamento.

**Figura 31. Microscopia óptica das amostras de esponja após lavagem. A: embebida em azul de metileno em magnificação de 200x; B-1 e B-2: formulação de congelamento e azul de metileno em magnificação de 200x.**



O experimento de permeação em materiais porosos também foi feito com a utilização de cerâmica. A cerâmica usada foi obtida a partir de corte de uma vela de filtro molhada, embebida na formulação e colocada para congelar. A Figura 32 mostra a fratura das cerâmicas embebidas na formulação de congelamento, porém apenas a amostra da Figura 32 B foi congelada. A formulação foi corada com azul de metileno e é possível observar pontos azuis na amostra da formulação que preenche os pequenos poros da cerâmica, o que sugere que assim como no congelamento feito utilizando esponja, também houve formação de gel.

**Figura 32.** Microscopia óptica das amostras de cerâmica após lavagem (A) pura com azul de metileno em magnificação de 100x; (B) com formulação de congelamento e azul de metileno em magnificação de 200x.



A prova de conceito sobre a permeação da formulação de congelamento, permite o uso desta técnica para a modulação de propriedades de estruturas porosas já formadas, permitindo a inserção de aditivos antimicrobianos ou o preenchimento de espaços em membranas para influenciar a velocidade de permeação.

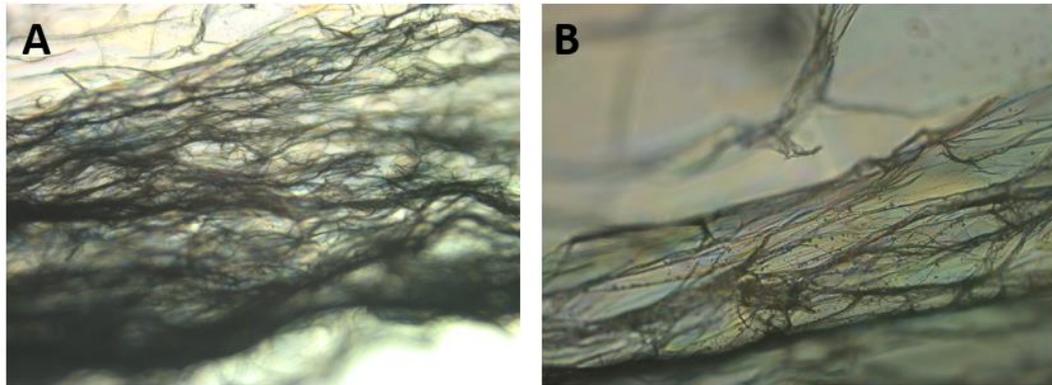
## 6.8 Gel unidirecional

A formulação foi congelada de maneira unidirecional em sistema *Peltier* e gerou um gel frágil, o que dificultou a secagem por solventes apolares. Para observar a direção dos poros desse tipo de congelamento foi feita a liofilização do material que está registrado na Figura 33, com o uso de câmera fotográfica. Por conta do controle da direção do congelamento, os cristais formados seguem uma única direção e após o descongelamento exibem um padrão de direcionamento, antes ocupado pelos cristais de gelo (Figura 34). Como apresentado por Landi et al (2013) as estruturas porosas unidirecionais têm interesse por conta de possibilitar maior permeabilidade de substâncias na direção de canais.

**Figura 33.** Gel unidirecional formado no processo de congelamento pelo sistema com placa *Peltier*.



**Figura 34. Microscopia ótica da superfície do gel unidirecional, figura A em magnificação de 50x e B em magnificação de 200x**



A amostra liofilizada apresentou as características esponjosa e porosa, mostrando que é possível obter poros unidirecionados através de outro sistema além do equipamento de dedo frio, usado na técnica de *ice template*. A análise da superfície do gel por microscopia ótica mostrou ranhuras que indicam a direção da formação dos poros, confirmando a característica direcionada do gel, que foi o objetivo do experimento.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos foi determinado que é possível produzir materiais porosos através de formulações de alginato de cálcio de forma simples, substituindo os equipamentos convencionais de *ice template*, formando materiais de poros multidirecionais e unidirecionais. As varreduras permitiram determinar a formulação de 0,15 g/100 g de alginato de sódio com 0,0010 mol/L de CaCl<sub>2</sub> como a ideal para formação de géis porosos, por conta do melhor rendimento mássico.

Ainda que não seja considerada ideal, a secagem com butanol foi a que melhor manteve a integridade estrutural dos géis e os compósitos de café além de auxiliar na estrutura do gel, possibilitou a prospecção para novas aplicações aos géis produzidos.

Provamos o conceito de permear a formulação de congelamento em materiais porosos e produzir géis por congelamento dentro de seus poros.

## 8 SUGESTÕES FUTURAS

Entre os trabalhos que ainda podem ser feitos com os resultados obtidos, seria interessante a análise de outros tipos de solventes, com menor ou nenhuma toxicidade, ao invés do uso de butanol para retirar a água dos géis, eliminando a necessidade da liofilização.

Devido as diferentes morfologias da superfície e interior do gel (como vista nas figuras Figura 18 e Figura 19), a quantificação da concentração de  $\text{CaCl}_2$  nas duas partes poderia ser um fator relevante, pois assim há a possibilidade de confirmar se a diferença entre concentrações influencia no tipo e tamanho dos poros formados, esse teste pode ser feito qualitativamente através de MEV/EDS-Microscópio Eletrônico de Varredura com Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X ou quantitativamente pela destruição das diferentes partes e determinação da concentração de cálcio nas mesmas.

A medida dos tamanhos de poro, porosidade e interconexão dos poros do material também é um trabalho necessário a ser feito, visto que para a utilização em engenharia de tecidos e cultivo celular o tamanho dos poros tem grande importância, assim como para a fluidez de fluidos em membranas.

A utilização dos compósitos de café para testes de adsorção é uma alternativa para o uso do gel, portanto fazer estudos relacionados a adsorção de poluentes é uma das atividades que podem ser feitas futuramente, mantendo a ideia de sustentabilidade e de baixo de custo no trabalho. Uma outra alternativa de desenvolvimento de trabalho seria utilizar resíduos da produção de alginato que teriam capacidade de gelificação e menor custo, aumentando a sustentabilidade do processo por encontrar aplicações para o seu resíduo. Trabalhos com a utilização de biomassa têm sido feitos por Cardoso et al. (2017) e podem ser utilizados como precursores na produção de géis produzidos a partir da biomassa, que também apresenta características de adsorção.

## REFERÊNCIAS

- BAI, Hao et al. Biomimetic gradient scaffold from ice-templating for self-seeding of cells with capillary effect. **Acta Biomaterialia**, v. 20, p.113-119, 2015.
- BIGLIA, Alessandro et al. Case Studies in Food Freezing at Very Low Temperature. **Energy Procedia**, v. 101, p.305-312, 2016.
- BRODERICK, Eilish et al. The characterisation of a novel, covalently modified, amphiphilic alginate derivative, which retains gelling and non-toxic properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, n. 1, p.154-161, 2006.
- CARDOSO, Saulo Luiz et al. Dealginated seaweed waste for Zn(II) continuous removal from aqueous solution on fixed-bed column. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 4, p.1183-1189, 2017.
- COLLA, Luciane Maria; PRENTICE-HERNÁNDEZ, Carlos. Congelamento e descongelamento – sua influência sobre os alimentos. **Vetor**, Ff, v. 1, n. 13, p.53-66, 2003.
- DEVILLE, S. Morphologies of ice-templated macroporous ceramics, obtained using different solvents and conditions, **figshare**, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4036101.v1> > Acesso em 10 jun. 2018
- DEVILLE, S. Close-up view of the architecture of the nacre of an abalone shell, **figshare**, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4036089.v1> > Acesso em 10 jun. 2018
- DEVILLE, S. Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues. **Advanced Engineering Materials**, v. 10, n. 3, p.155-169, 2008.
- DEVILLE, S. Schematic representation of ice-templating principles, **figshare**, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4591786.v1> > Acesso em 10 jun. 2018
- DEVILLE, Sylvain. Freeze-Casting of Porous Biomaterials: Structure, Properties and Opportunities. **Materials**, v. 3, n. 12, p.1913-1927, 2010.
- DEVILLE, Sylvain; MEILLE, Sylvain; SEUBA, Jordi. A meta-analysis of the mechanical properties of ice-templated ceramics and metals. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 4, p.1-15, 16 jul. 2015.

DROTLEFF, S et al. Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p.385-407, 2004.

DUTTA, Saikat; BHAUMIK, Asim; WU, Kevin C.-w. Hierarchically porous carbon derived from polymers and biomass: effect of interconnected pores on energy applications. **Energy Environ. Sci.**, v. 7, n. 11, p.3574-3592, 2014.

FARRÉS, I. Fernández; NORTON, I.t. Formation kinetics and rheology of alginate fluid gels produced by in-situ calcium release. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p.76-84, 2014.

FRANCA, Adriana S.; OLIVEIRA, Leandro S.; FERREIRA, Mauro E. Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds. **Desalination**, v. 249, n. 1, p.267-272, 2009.

FRANCIS, Nicola L. et al. An ice-templated, linearly aligned chitosan-alginate scaffold for neural tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 12, p.3493-3503, 2013.

FRANKS, Felix; AUFFRET, Tony. **Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals: Principles and Practice**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007.

GAUDILLERE, Cyril; SERRA, José Manuel. Freeze-casting: Fabrication of highly porous and hierarchical ceramic supports for energy applications. **Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 55, n. 2, p.45-54, 2016.

GAWRYLA, Matthew D.; SCHIRALDI, David A. Novel Absorbent Materials Created via Ice Templating. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 294, n. 9, p.570-574, 2009.

GEORGE, Meera; ABRAHAM, T. Emilia. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p.1-14, ago. 2006.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. Adsorption, Surface Area and Porosity. **Academic Press**, p.197-199, 1997.

GUTIÉRREZ, María C.; FERRER, María L.; MONTE, Francisco del. Ice-Templated Materials: Sophisticated Structures Exhibiting Enhanced Functionalities Obtained after Unidirectional Freezing and Ice-Segregation-Induced Self-Assembly. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 3, p.634-648, 2008.

HIRST, E.L., et al., "The Structure of Alginic Acid. Part I.", **J. Chem. Society**, pg. 1885, 1939.

HOU, Xu. Design, **Fabrication, Properties and Applications of Smart and Advanced Materials**. Crc Press, p. 450, 2016.

HOU, Xu; JIANG, Lei. Learning from Nature: Building Bio-Inspired Smart Nanochannels. **Acs Nano**, v. 3, n. 11, p.3339-3342, 2009.

ISHIZAKI, Kozo; KOMARNENI, Sridhar; NANKO, Makoto. **Porous Materials: Process technology and applications**. Springer, 1998. 240 p.

JAMES, Christian; ONARINDE, Bukola A.; JAMES, Stephen J. The Use and Performance of Household Refrigerators: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 1, p.160-179, 2016.

KAR, F.; ARSLAN, N. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 4, p.277-284, 1999

KAWAMURA, N. et al. Bone mass and formation are decreased in Akt1  $\Delta$  mice. **PLOS ONE**, **figshare**, 2007, Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001058.g001>> Acesso em: 10 jun. 2018.

KRISTIANSEN, U.; VINGGAARD, A. M.; NIELSEN, G. D. The effects of n-butanol vapour on respiratory rate and tidal volume. **Archives of Toxicology**, v. 61, n. 3, p.229-236, 1988.

LANDI, Elena et al. Ice templating of ZrB<sub>2</sub> porous architectures. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 33, n. 10, p.1599-1607, 2013

LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p.106-126, 2012.

LI, Qi et al. Filtration and adsorption properties of porous calcium alginate membrane for methylene blue removal from water. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p.623-630, 2017.

LIBBRECHT, Kenneth G. Physical Dynamics of Ice Crystal Growth. **Annual Review of Materials Research**, v. 47, n. 1, p.271-295, 2017.

LIKHACHEV, E. R. Dependence of Water Viscosity on Temperature and Pressure. **Technical Physics**, v. 48, n. 4, p.135-136, 2003.

LIU, Gang; BUTTON, Tim W. The effect of particle size in freeze casting of porous alumina-zirconia composite. **Ceramics International**, v. 39, n. 7, p.8507-8512, 2013.

LIU, Ruiping; XU, Tingting; WANG, Chang-an. A review of fabrication strategies and applications of porous ceramics prepared by freeze-casting method. **Ceramics International**, v. 42, n. 2, p.2907-2925, 2016.

LOO, Siew-leng et al. Design and synthesis of ice-templated PSA cryogels for water purification: towards tailored morphology and properties. **Soft Matter**, v. 9, n. 1, p.224-234, 2013

LUCHETTI, Natália da Mata. **Protocolo para preparação de espécimes para microscopia eletrônica de varredura**. Disponível em: <[http://www.ib.usp.br/~fernando/pdf/SEM\\_protocol.pdf](http://www.ib.usp.br/~fernando/pdf/SEM_protocol.pdf)>. Acesso em: 07 dez. 2017.

MAO, Mao et al. Ice-template-induced silk fibroin-chitosan scaffolds with predefined microfluidic channels and fully porous structures. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 6, p.2175-2184, 2012.

MDSAHILJMI0. Xylem-1024x736, 2017, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Xylem-1024x736.jpg>

MOORE, Michael J. et al. Quantitative analysis of interconnectivity of porous biodegradable scaffolds with micro-computed tomography. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 71, n. 2, p.258-267, 2004.

MORITZ, Tassilo; RICHTER, Hans-jürgen. Ice-mould freeze casting of porous ceramic components. **Journal of The European Ceramic Society**, v. 27, n. 16, p.4595-4601, 2007.

MUNCH, Etienne et al. Architectural Control of Freeze-Cast Ceramics Through Additives and Templating. *Journal of The American Ceramic Society*, v. 92, n. 7, p.1534-1539, jul. 2009.

NUNES, Suzana P. et al. Ultraporous Films with Uniform Nanochannels by Block Copolymer Micelles Assembly. **Macromolecules**, v. 43, n. 19, p.8079-8085, 12 out. 2010.

PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 18, n. 1, p.18-23, 2004.

PAWAR, Siddhesh N.; EDGAR, Kevin J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p.3279-3305, 2012.

PELEKANI, Costas; SNOEYINK, Vernon L. Competitive adsorption between atrazine and methylene blue on activated carbon: the importance of pore size distribution. **Carbon**, v. 38, n. 10, p.1423-1436, 2000.

PLÖTZE, Michael; NIEMZ, Peter. Porosity and pore size distribution of different wood types as determined by mercury intrusion porosimetry. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 69, n. 4, p.649-657, 2010.

SADER, Márcia S.; FERREIRA, Marysilvia; DIAS, Marcos L. Preparação e caracterização de estruturas porosas de poli(3-hidroxibutirato). *Polímeros, São Carlos*, v. 16, n. 1, p. 12-18, 2006

SAND, Arpit et al. Alginic acid-g-poly(N-vinylformamide) graft copolymer: Synthesis, characterization, swelling, and flocculation property. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 3, p.1400-1407, 3 mar. 2011.

SANTOS, Amanda V et al. O Incrível Mundo dos Materiais Porosos – Características, Propriedades e Aplicações. *Química Nova na Escola*, v. 38, n. 1, p.4-11, 2016.

SCHONHERR, J. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 11, p.2471-2491, 2006.

SCIENCE & FOOD. Deconstructed Apple Pie. Disponível em:

<<https://scienceandfooducla.wordpress.com/2013/06/11/deconstructed-apple-pie/>> Acesso

em: 18 mai. 2018

SILVA, Lucimara Lopes da; GALEMBECK, Fernando. Morphology of latex and nanocomposite adsorbents prepared by freeze-casting. *Journal of Materials Chemistry A*, v. 3, n. 14, p.7263-7272, 2015.

SING, K. S. W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure and Applied Chemistry*, v. 57, n. 4, p.603-619, 1985.

VIEIRA, Heulla Pereira; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p.535-540, 2007.

WEGST, U. G. K. et al. Biomaterials by freeze casting. ***Philosophical Transactions of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences***, v. 368, n. 1917, p.2099-2121, 2010.

WU, Chengtie et al. Mussel-inspired porous SiO<sub>2</sub> scaffolds with improved mineralization and cytocompatibility for drug delivery and bone tissue engineering. ***Journal of Materials Chemistry***, v. 21, n. 45, p.18300-18307, 2011.

YOON, B.; KOH, Y. H.; PARK, C. S.; KIM, H. E. Generation of Large Pore Channels for Bone Tissue Engineering Using Camphene-Based Freeze Casting. ***J. Am. Ceram. Soc.***, v. 90, pp. 1744–1752, 2007.

ZHU X. F. et al., "The Formation of Ice Lenses in Unidirectional and Multidirectional Freezing Soil", ***Applied Mechanics and Materials***, Vols. 353-356, pp. 68-73, 2013

ZUO, Kai Hui; ZENG, Yu-ping; JIANG, Dongliang. Properties of Microstructure-Controllable Porous Yttria-Stabilized Zirconia Ceramics Fabricated by Freeze Casting. ***International Journal of Applied Ceramic Technology***, v. 5, n. 2, p.198-203, 2008

## APÊNDICE - A

A água utilizada foi da marca Lindoya, da empresa Genuína. A coleta é realizada na Fonte São Bernardo, localizada em Lindoia/SP. Os testes de especificações da água foram realizados pelos Laboratórios de Rede de Laboratórios de Análises Mineraias da CPRM. As características físico-químicas obtidas em teste são: pH de 6,48 A 25°C, resíduo de evaporação a 180°C de 127,31 mg/L e condutividade de 133  $\mu$ S/cm a 25°C.

A composição de minerais pode ser vista na Tabela 1:

**Tabela 1. Composição de minerais Água Mineral Lindoya**

Mineral	Quantidade (mg/L)	Mineral	Quantidade (mg/L)
<b>Bário</b>	0,022	<b>Fluoreto</b>	0,08
<b>Bicarbonato</b>	86,01	<b>Magnésio</b>	4,999
<b>Cálcio</b>	11,240	<b>Nitrato</b>	1,69
<b>Cloreto</b>	0,53	<b>Potássio</b>	1,65
<b>Estrôncio</b>	0,055	<b>Sódio</b>	10,340
<b>Sulfato</b>	0,53	<b>Brometo</b>	0,01

Foi utilizada também a água da marca Crystal, da empresa Coca-Cola Brasil. A coleta é realizada na Fonte José Gregório, localizada em Lindoia/SP. Os testes de especificações da água foram realizados pelos Laboratórios de Rede de Laboratórios de Análises Mineraias da CPRM. As características físico-químicas obtidas em teste são: pH de 8,45 a 25°C, resíduo de evaporação a 180°C de 84,69 mg/L e condutividade de 123,5  $\mu$ S/cm a 25°C.

A composição de minerais pode ser vista na Tabela 2:

**Tabela 2. Composição de minerais Água Mineral Crystal**

Mineral	Quantidade (mg/L)	Mineral	Quantidade (mg/L)
<b>Bicarbonato</b>	66,06	<b>Fluoreto</b>	0,04
<b>Cálcio</b>	8,08	<b>Magnésio</b>	0,36
<b>Carbonato</b>	5,21	<b>Nitrato</b>	0,06
<b>Estrôncio</b>	0,353	<b>Potássio</b>	2,06
<b>Sulfato</b>	0,17	<b>Sódio</b>	17,70

## ANEXO I – Viscosidade e degradação da formulação após o armazenamento

O objetivo do experimento foi observar se há diferenças no aspecto da solução após o armazenamento, para permitir o preparo de maiores quantidades para uso posterior. Sendo assim, a formulação de congelamento foi mantida em geladeira e temperatura ambiente por 7 dias, sendo analisado o aspecto visual da amostra a cada 24h para determinar se houve alteração visual da formulação após o armazenamento, determinando a degradação com o início de turbidez das amostras.

Foi também realizado o experimento de análise da viscosidade da solução por 7 dias, medindo o tempo em que a solução leva escoar em uma seringa, em cada um dos dias, para analisar se houve diferença na viscosidade. Foi utilizada água como fluído de referência, através da densidade pela temperatura apresentada no dia do experimento. Todas as amostras foram usadas estando na mesma temperatura da água destilada utilizada. O experimento foi realizado em triplicata e a viscosidade da solução foi calculada por:

### Equação 1. Equação usada para cálculo da viscosidade da formulação

$$\mu = \frac{\mu_{H_2O} \times (t \times \rho)}{t_{H_2O} \times \rho_{H_2O}}$$

Onde:

$\mu$ = viscosidade ( $m^2/s$ )

$\rho$ = densidade da formulação ( $\rho$ )

$\mu_{H_2O}$  = viscosidade da água ( $m^2/s$ )

$t_{H_2O}$  = tempo de escoamento da água (s)

$t$ = tempo de escoamento da formulação (s)

$\rho_{H_2O}$ = densidade da água ( $\rho$ )

As amostras da formulação foram mantidas em armazenamento ambiente (armário) e refrigerador para analisar a degradação da amostra durante o período de 7 dias (Tabela 3). A determinação de degradação foi feita considerando o início de turbidez da solução, que foi observado através da análise visual.

Entre amostras armazenadas em temperatura ambiente, a turbidez teve início a partir do terceiro dia. Segundo Sand et al (2011), soluções de polissacarídeos, assim como o alginato, após 72h começam a se degradar, mostrando que a análise de turbidez pode indicar que nesse período há o início da degradação das formulações. As amostras mantidas em refrigerador levaram maior tempo para apresentar sinais de turbidez. Como abordado por Franks e Auffret (2007), o processo de resfriamento causa a diminuição das atividades metabólicas, e por isso, as amostras resfriadas apresentarem sinais de degradação mais tardio que as amostras em ambiente, mostrando que o tempo de vida das amostras submetidas a refrigeração é de aproximadamente 2 dias a mais do que as armazenadas em ambiente.

**Tabela 3. Análise visual do aspecto da formulação após armazenamento em temperatura ambiente e refrigerador**

Amostra	Condição	Período (Dias)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Geladeira							
2	Geladeira							
3	Geladeira							
1	Ambiente							
2	Ambiente							
3	Ambiente							

Legendas: Azul – Límpido / Cinza - Túrbido

O experimento de viscosidade, também realizado durante 7 dias, mostrou nos 3 primeiros dias o aumento da viscosidade da solução (Tabela 4), esse aumento de viscosidade pode ser referente aos microrganismos que se proliferam na solução, pois em alguns dias há o decréscimo da viscosidade, já que o polissacarídeo é utilizado para o metabolismo desses microrganismos. Sand et al (2011) também observou que após 10 dias houve a perda considerável de viscosidade de polissacarídeos.

**Tabela 4. Viscosidade (m/s<sup>2</sup>) das amostras de água e média da viscosidade da formulação ao longo de 7 dias**

Amostra	Período (Dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
Água	0,00087	0,00085	0,00083	0,00087	0,00089	0,00091	0,00089
Formulação	0,0021± 0,00004	0,0021± 0,00003	0,0021± 0,00005	0,0025± 0,00005	0,0022± 0,00004	0,0017± 0,00008	0,0013± 0,00004

## ANEXO II – Dados da exploração de parâmetros experimentais para formulação com formação de gel

### Exploração de parâmetros utilizando água destilada

Tabela 5. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 1 feita com o uso de água destilada

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0007	0,001	0,0012	0,0015	0,0017
0,15	●●#	●●#	□□□	###	***
0,45	●●●	●●#	●●□	●*□	***
0,82	###	●*□	●●□	●●□	***
1,20	###	***	***	***	***
1,57	###	***	***	***	***

Legenda: \* - Gelificou antes do congelamento/ # - Não formou gel/ □ - Não congelou/ ● - Formou gel

Tabela 6. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações feitas com água destilada

Água Destilada	
Símbolo	Nota
###	0
***	0
●*□	1
●●#	2
●●□	2
●●●	3

Tabela 7. Aspecto visual dos géis formados utilizando água destilada, seguindo as notas determinadas na Tabela 6

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0007	0,0010	0,0012	0,0015	0,0017
0,15	2	2	0	0	0
0,45	3	2	2	1	0
0,82	0	1	2	2	0
1,20	0	0	0	0	0
1,57	0	0	0	0	0

**Tabela 8. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 2 feita com o uso de água destilada**

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0005	0,0007	0,0010	0,0012	0,0015
0,15	●●●	●●●	***	***	***
0,30	●●●	●●●	●●□	***	***
0,45	●●□	●●●	###	***	***
0,60	●□□	●●●	●##	***	***
0,75	□□□	●●*	●●*	●●*	***

**Legenda:** \* - Gelificou antes do congelamento/ # - Não formou gel/ □ - Não congelou/ ● - Formou gel

**Tabela 9. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações feitas com água destilada**

Água Destilada	
Símbolo	Nota
***	0
###	0
□□□	0
●##	1
●□□	1
●●□	2
●●*	2
●●●	3

**Tabela 10. Aspecto visual dos géis formados utilizando água destilada, seguindo as notas determinadas na Tabela 9**

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0005	0,0007	0,0010	0,0012	0,0015
0,15	3	3	0	0	0
0,30	3	3	2	0	0
0,45	2	3	0	0	0
0,60	0	3	1	0	0
0,75	0	2	2	2	0

## Exploração de parâmetros utilizando água deionizada

Tabela 11. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 1 feita com o uso de água deionizada

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0007	0,0010	0,0012	0,0015	0,0017
0,15	●●●	●●#	###	###	###
0,45	●●●	●●#	###	###	###
0,82	###	###	###	###	###
1,20	###	###	###	###	###
1,57	###	###	###	###	###

Tabela 12. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações feitas com água deionizada

Água Deionizada	
Símbolo	Nota
# # #	0
●●#	1
●●●	2

Tabela 13. Aspecto visual dos géis formados utilizando água deionizada, seguindo as notas determinadas na Tabela 12

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0007	0,0010	0,0012	0,0015	0,0017
0,15	2	1	0	0	0
0,45	2	1	0	0	0
0,82	0	0	0	0	0
1,20	0	0	0	0	0
1,57	0	0	0	0	0

Tabela 14. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 2 feita com o uso de água deionizada

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0005	0,0007	0,0010	0,0012	0,0015
0,15	###	###	###	###	###
0,30	###	###	###	###	###
0,45	●●#	●●●	###	###	###
0,60	●●●	●●●	###	###	###
0,75	●●●	●●●	###	###	###

**Tabela 15. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações feitas com água deionizada**

<b>Água Deionizada</b>	
Símbolo	Nota
###	0
●●#	1
●●●	2

**Tabela 16. Aspecto visual dos géis formados utilizando água deionizada, seguindo as notas determinadas na Tabela 15**

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0005	0,0007	0,0010	0,0012	0,0015
<b>0,15</b>	0	0	0	0	0
<b>0,30</b>	0	0	0	0	0
<b>0,45</b>	1	2	0	0	0
<b>0,60</b>	2	2	0	0	0
<b>0,75</b>	2	2	0	0	0

### Exploração de parâmetros utilizando água mineral

**Tabela 17. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 3**

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0005	0,0008	0,0010	0,0013	0,0015
<b>0,05</b>	ooo	ooo	ooo	ooo	ooo
<b>0,10</b>	###	!!#	xxx	***	***
<b>0,15</b>	###	###	!!!	***	***
<b>0,20</b>	###	!!!	xxx	***	***
<b>0,25</b>	###	###	***	***	***

**Legenda:** \* - Gelificou antes do congelamento/ # - Não formou gel/ o – Pequeno e resistente/! – Grande e frágil/  
x - Grande e resistente/

Tabela 18. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações

Símbolo	Nota
###	0
***	0
ooo	1
!!#	2
!!!	3
xxx	4

Tabela 19. Aspecto visual dos géis formados, seguindo as notas determinadas na Tabela 18

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0005	0,0008	0,0010	0,0013	0,0015
0,05	1	1	1	1	1
0,10	0	2	4	0	0
0,15	0	0	3	0	0
0,20	0	3	4	0	0
0,25	0	0	0	0	0

Tabela 20. Aspecto visual dos géis após o congelamento das formulações da condição 4

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0006	0,0008	0,0009	0,0010	0,0011
0,02	ooo	ooo	ooo	ooo	ooo
0,05	ooo	ooo	ooo	ooo	ooo
0,75	###	!!!	!!!	!!!	ooo
0,10	###	!!!	!!!	!!#	!!!
0,125	!!!	!!!	!!!	!!#	!!!
0,15	!!!	!!!	!!!	!!!	xxx
0,175	!!!	!!#	!!!	!!!	xxx

**Legenda:** # - Não formou gel/ o – Pequeno e resistente/! – Grande e frágil/ x - Grande e forte

Tabela 21. Notas dadas aos géis formados após o congelamento das formulações.

Símbolo	Nota
###	0
!##	1
ooo	2
!!#	3
!!!	4
xxx	5

Tabela 22. Ranking dos aspectos visuais dos géis formados, seguindo as notas determinadas na

Tabela 21

Alginato (g/100g)	CaCl <sub>2</sub> (mol/L)				
	0,0006	0,0008	0,0009	0,0010	0,0011
0,02	2	2	2	2	2
0,05	2	2	2	2	2
0,75	0	4	4	4	2
0,10	0	4	4	3	4
0,125	4	4	4	3	4
0,15	4	4	4	4	5
0,175	4	3	4	4	5