



**Maria Beatriz da Rocha Veleirinho** **Desenvolvimento de membranas nanofibrosas por electrospinning – potencial aplicação na clarificação de sumos**



**Maria Beatriz da Rocha Veleirinho** **Desenvolvimento de membranas nanofibrosas por electrospinning – potencial aplicação na clarificação de sumos**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Teixeira Lopes da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva,  
Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes,  
Professor auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Doutora Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida,  
Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutor José António Teixeira Lopes da Silva  
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro (orientador)

## agradecimentos

Ao Professor José António Teixeira Lopes da Silva, pela oportunidade que me proporcionou de trabalhar com um tema que tanto me fascinou, o electrospinning, e que aumentou ainda mais o meu interesse pela investigação científica... por todo apoio prestado e por todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo deste trabalho.

À Professora Ivonne Delgadillo, por ter me incentivado a trabalhar no projecto BIOTEX, que foi o ponto de partida para este trabalho.

Ao Professor Dmitry pela ajuda prestada com os ensaios de GPC.

Ao Dr. Manuel Rei e ao Carlos Braga, do CITEVE, pelas horas disponibilizadas para a realização dos ensaios SEM.

À Eng<sup>a</sup> Carla Santos pelo fornecimento da amostra de PET, essencial para a realização deste trabalho.

À Eng<sup>a</sup> Cristina Santos, da Escola Superior de Biotecnologia (UCP), pelos ensaios de HPLC que gentilmente realizou.

À Virgínia, minha única mas excelente colega de mestrado, pelo companheirismo que sempre demonstrou.

À Cati e à Regina, minhas colegas de grupo, pela ajuda que me deram, principalmente nesta última e acelerada etapa do trabalho.

Aos meus amigos do laboratório por todo o apoio que me deram e principalmente pelos excelentes momentos passados, pelas muitas risadas, enfim, por fazerem com que os dias de trabalho fossem uma alegria!

Ao Marcelo, minha maior motivação na realização deste trabalho...pelo seu amor.

À minha mãe pela sua dedicação, em todas as áreas da minha vida e desde sempre... pelos lanches caprichados, pela paciência nos momentos de mau humor, enfim, por tudo... se eu fosse descrever em detalhe ocuparia centenas de páginas!

A toda minha família e amigos, pelo apoio e carinho de sempre...

**palavras-chave**

Poli(tereftalato de etileno); quitosano; nanofibras; electrospinning; membranas fibrosas; clarificação de sumos.

**resumo**

O objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de matrizes fibrosas para clarificação de sumos. Deste modo, foram produzidas por electrospinning matrizes simples de poli(tereftalato de etileno) (PET) e matrizes bicomponentes (PET+ quitosano).

A influência de alguns parâmetros no processo de electrospinning, tais como a composição do solvente, a concentração de polímero e as configurações operacionais do sistema, foi analisada. Avaliaram-se também os efeitos da variação da concentração e da massa molecular do quitosano nas matrizes bicomponentes. A morfologia das fibras foi avaliada por microscopia óptica (MO) e microscopia de varrimento electrónico (SEM). A presença dos dois polímeros na matriz (PET e quitosano) foi examinada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As propriedades mecânicas das matrizes de PET e PET+quitosano foram testadas através de ensaios de tensão uniaxial. Estudou-se o comportamento destas matrizes fibrosas quando em contacto com a água e com meio aquoso ácido. Analisou-se o potencial de aplicação destas matrizes no processo de clarificação de sumos, utilizando como modelo o sumo de maçã.

Os resultados obtidos permitiram compreender melhor o funcionamento da técnica de electrospinning e alguns dos parâmetros que a governam. Desenvolveram-se matrizes fibrosas bicomponentes a partir de dois polímeros muito diferentes, onde cada polímero ocupa preferencialmente uma zona de cada fibra. As matrizes obtidas mostraram um potencial de clarificação semelhante aos processos tradicionais. A morfologia e a estrutura das matrizes fibrosas desenvolvidas apresentam potencialidade de aplicação em diversas áreas, para além da filtração, nomeadamente em aplicações biomédicas.

**keywords**

Poly(ethylene terephthalate); chitosan; nanofibers; electrospinning; fibrous mats; juice clarification.

**abstract**

The aim of this work was the development of nanofibrous mats with potential application on juice clarification. Electrospinning was used to produce poly(ethylene terephthalate) (PET) nanofibrous mats and “PET-chitosan” bicomponent nanofibrous mats.

The influence of some electrospinning parameters, such as solvent system, polymer concentration and operational conditions, was analysed. For the bicomponent nanofibrous mats, the effect of changing concentration and molecular weight of chitosan was also evaluated. Fiber morphology and size distribution was investigated by optical and scanning electronic microscopy (SEM). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to evaluate the presence of both polymers (PET and chitosan) in the bicomponent mats. Mechanical properties of the PET and PET+chitosan mats were studied by uniaxial tension tests. Nanofibrous mats solubility in water and acid was also study. The potential application of these mats on juice clarification was performed using apple juice as study model.

The knowledge on how to control the electrospinning conditions to achieve final desired properties of the mats was improved with this work. Bicomponent fibrous mats were developed using two distinct polymers, where each polymer occupy a specific zone of the fiber. These nanomats revealed potential in juice clarification, similar to conventional clarification treatments. These nanomats have a great potential, not only in juice clarification, but also in other fields, especially on biomedical field.



# Índice

<b>Júri</b> .....	iii
<b>Agradecimentos</b> .....	iv
<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vi
<b>Índice</b> .....	vii
<b>Prefácio</b> .....	1
<b>Capítulo 1- Optimização da produção de nanomatrizes de PET por electrospinning</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. Introdução</b> .....	<b>4</b>
1.1.1. Princípios e aplicações do electrospinning.....	4
1.1.2. Parâmetros que influenciam o processo de electrospinning.....	6
1.1.2.1. Propriedades da solução.....	7
1.1.2.2. Condições operacionais.....	8
<b>1.2. Materiais e métodos</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Amostras.....	10
1.2.2. Sistema de electrospinning.....	10
1.2.3. Preparação das soluções para electrospinning.....	11
1.2.4. Optimização dos parâmetros operacionais do sistema de electrospinning.....	11
1.2.5. Estudo do efeito da variação da concentração de PET e da composição do solvente.....	11
1.2.6. Caracterização morfológica das matrizes.....	12
<b>1.3. Resultados e discussão</b> .....	<b>12</b>
1.3.1. Condições operacionais do electrospinning.....	13
1.3.1.1. Fluxo da solução.....	13
1.3.1.2. Distância agulha-colector.....	14

1.3.1.3. Velocidade de rotação do colector.....	15
1.3.1.4. Diferença de potencial aplicada.....	16
1.3.2. Propriedades da solução.....	16
1.3.2.1. Efeito da variação da concentração.....	16
1.3.2.2. Efeito do solvente.....	20
<b>1.4. Conclusões.....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo 2- Desenvolvimento de nanofibras mistas de PET e quitosano.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Introdução.....</b>	<b>28</b>
2.1.1 Quitosano.....	28
2.1.2. Produção de nanofibras de quitosano por electrospinning.....	28
2.1.3. Termodinâmica da solubilidade de polímeros.....	29
2.1.4. Diminuição da massa molecular do quitosano.....	30
<b>2.2. Materiais e métodos.....</b>	<b>30</b>
2.2.1. Amostras.....	30
2.2.2. Preparação de amostras de quitosano com diferentes massas moleculares	31
2.2.2.1. Hidrólise do quitosano com ácido nítrico.....	31
2.2.2.2. Determinação da massa molecular das amostras de quitosano por GPC.....	31
2.2.3. Estudo da compatibilidade (co-solubilidade) dos polímeros.....	32
2.2.3.1. PET e quitosano não hidrolisado (QO).....	32
2.2.3.2. PET e quitosano hidrolisado .....	32
2.2.4. Preparação das soluções para electrospinning.....	32
2.2.5. Electrospinning das soluções .....	33
2.2.6. Caracterização morfológica das matrizes.....	33
2.2.7. Ensaio de solubilidade das matrizes.....	34
2.2.8. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).	35
2.2.9. Caracterização de propriedades mecânicas das matrizes .....	35
<b>2.3. Resultados e discussão.....</b>	<b>35</b>
2.3.1. Compatibilidade dos polímeros (PET + quitosano).....	35
2.3.1.1. Quitosano de massa molecular elevada .....	35
2.3.1.2. Quitosano hidrolisado.....	36

2.3.1.2.1. Hidrólise do quitosano e caracterização das amostras obtidas..	36
2.3.1.2.2. Ensaio de compatibilidade.....	36
2.3.2. Ajuste do processo de electrospinning.....	38
2.3.3. Distribuição dos polímeros na matriz.....	38
2.3.4. Solubilidade das matrizes em água e tampão acetato pH 3,8.....	41
2.3.5. Propriedades mecânicas das matrizes.....	49
<b>Capítulo 3- Aplicação das matrizes na clarificação do sumo de maçã –     ensaios preliminares.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Introdução .....</b>	<b>54</b>
3.1.1. Clarificação de sumo de maçã.....	54
3.1.2. Agentes de clarificação.....	54
3.1.3. Ultrafiltração.....	55
3.1.4. Electrospinning e membranas de filtração.....	55
<b>3.2. Materiais e métodos.....</b>	<b>56</b>
3.2.1. Amostras.....	56
3.2.2. Preparação do sumo de maçã.....	56
3.2.3. Clarificação do sumo de maçã.....	57
3.2.3.1. Processo convencional .....	57
3.2.3.2. Processo de clarificação com membranas produzidas por electrospinning.....	57
3.2.3.2.1. Produção da matriz dupla camada (DC).....	57
3.2.3.2.2. Filtração com as membranas produzidas por electrospinning..	57
3.2.3.3. Ultrafiltração.....	58
3.2.3.4. Tratamento com quitosano (pó).....	58
3.2.4. Métodos de análise do sumo de maçã .....	58
3.2.4.1. Determinação da turbidez e cor.....	58
3.2.4.2. Sólidos totais.....	58
3.2.4.3. Sólidos solúveis.....	58
3.2.4.4. pH e acidez titulável.....	59
3.2.4.5. Determinação do teor de fenólicos totais.....	59
3.2.4.6. Teor de proteínas.....	60

3.2.4.7. Análise de açúcares por HPLC.....	60
3.2.4.8. Análise de ácidos orgânicos por HPLC.....	60
3.2.4.9. Análise estatística .....	60
<b>3.3. Resultados e discussão.....</b>	<b>61</b>
3.3.1. Escolha dos tratamentos.....	61
3.3.1.1. Tratamento com a membrana de PET.....	62
3.3.1.2. Tratamentos com as membranas mistas (PET + quitosano).....	62
3.3.1.3. Tratamento com a membrana dupla camada (DC).....	62
3.3.1.3.1. Análise morfológica da matriz dupla camada (DC).....	63
3.3.1.4. Tratamento com quitosano em pó (Q).....	65
3.3.1.5. Tratamentos de referência.....	65
3.3.2. Processo de clarificação: observações.....	65
3.3.3. Análise das características físico-químicas do sumo de maçã antes e após tratamento.....	66
3.3.3.1. Cor e Turbidez.....	67
3.3.3.2. Sólidos totais, sólidos solúveis, acidez titulável e pH.....	69
3.3.3.3. Ácidos orgânicos e açúcares .....	70
3.3.3.4. Compostos fenólicos.....	72
3.3.3.5. Proteínas.....	75
<b>3.4. Conclusões .....</b>	<b>77</b>
 <b>Considerações finais.....</b>	 <b>79</b>
 <b>Referências Bibliográficas.....</b>	 <b>83</b>

## **Prefácio**

O objectivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de membranas fibrosas e no estudo do potencial da sua aplicação no processo de clarificação do sumo de maçã. Para atingir este objectivo, utilizou-se a técnica de electrospinning para a produção das matrizes e diversos métodos de análise para sua caracterização e avaliação do seu potencial na aplicação pretendida.

Este trabalho foi organizado em três capítulos.

No primeiro capítulo é estudada a produção de matrizes de poli(tereftalato de etileno) (PET), de modo a otimizar as suas condições experimentais e desta forma permitir a obtenção de membranas com as características pretendidas para o processo de filtração.

No segundo capítulo é feita a introdução de um segundo polímero no sistema, o quitosano, com o objectivo de aumentar o poder clarificante das membranas de PET. Para tal, é feita uma avaliação das condições do sistema, nomeadamente no que diz respeito à compatibilidade entre os dois polímeros, que permitam a obtenção de fibras mistas de PET e quitosano. As alterações morfológicas das matrizes causadas pela introdução do quitosano são analisadas neste capítulo.

O último capítulo é dedicado à realização de ensaios preliminares, que permitiram testar a capacidade de clarificação das matrizes produzidas e analisadas nos capítulos anteriores. Essa avaliação é baseada nas modificações de propriedades físico-químicas do sumo causadas pelos processos de clarificação. O processo de clarificação de sumos por filtração através das membranas desenvolvidas é analisado comparativamente a métodos de clarificação tradicionais.



# **Capítulo 1**

## **Optimização da produção de nanomatrizes de PET por electrospinning**

## 1.1. Introdução

Como se demonstrará na breve revisão bibliográfica que a seguir se apresenta, existem vários parâmetros que podem afectar a morfologia e as propriedades de fibras obtidas por electrospinning. Assim, os objectivos principais deste primeiro capítulo consistem em determinar as condições adequadas para a obtenção de nanomatrizes de poli(tereftalato de etileno) (PET), utilizando como solventes misturas de ácido trifluoracético (TFA) e diclorometano (DCM), e compreender a influência de determinados factores relacionados quer com propriedades intrínsecas da solução (concentração do polímero, características do solvente), quer com condições operacionais (voltagem aplicada, distância entre a agulha e o colector, velocidade de fluxo da solução, modo de recolha das fibras).

### 1.1.1. Princípios e aplicações do electrospinning

O electrospinning é um processo simples e ao mesmo tempo eficaz para a produção de nanofibras. Apesar de descoberta e patenteada em 1934, por Formhals, esta técnica ficou esquecida por um longo período de tempo (Bognitzki *et al.* 2001). Foi a partir da última década, com o forte progresso da nanociência e nanotecnologia, que o electrospinning voltou a ser explorado. Desta vez, graças à evolução dos conhecimentos e ferramentas de análise de estruturas de dimensões nanométricas, foi possível compreender as potencialidades inerentes a esta técnica.

No processo de electrospinning, um polímero em solução é transformado numa matriz fibrosa por aplicação de uma diferença de potencial muito elevada. As fibras formadas distinguem-se das fibras obtidas pelos processos convencionais devido ao seu diâmetro reduzido, normalmente na ordem dos nanómetros. O sistema de electrospinning é tradicionalmente composto por uma fonte de alimentação de alta voltagem, uma bomba de seringa, uma seringa com uma agulha metálica e um colector. A solução polimérica é introduzida numa seringa e conduzida para a agulha através da bomba de seringa, formando uma gota na sua ponta. Quando uma diferença de potencial é aplicada entre a agulha e o colector, a gota adquire a forma de um cone, formando uma estrutura denominada por cone de Taylor. Sob condições apropriadas, ocorrerá a formação de um

jacto de solução electricamente carregado, que se dirige para o colector. Durante a trajetória deste jacto, as moléculas de polímeros sofrem estiramento e o solvente é evaporado, formando fibras que são recolhidas no colector (McCann *et al.* 2005). As fibras formadas normalmente são depositadas na forma de uma matriz não tecida (fibras desalinhas). No entanto, recentemente, têm sido desenvolvidas configurações inovadoras do sistema, de modo a obter fibras alinhadas (Chew *et al.* 2005; Subramanian *et al.* 2005) e fios (Dalton *et al.* 2005; Smit *et al.* 2005).

Actualmente já foram produzidas por electrospinning nanofibras de diversos polímeros e biopolímeros, o que demonstra a excepcional versatilidade desta técnica. A maior parte dos biopolímeros apresentam uma série de atributos, tais como a hidrofiliçidade, a não toxicidade e biocompatibilidade, que os torna vantajosos em muitas aplicações, face aos polímeros sintéticos. Estes compostos apresentam ainda a vantagem de serem, normalmente, menos poluentes e provenientes de fontes renováveis. No entanto, o sucesso do processo de electrospinning é mais difícil de ser alcançado no caso dos biopolímeros e as matrizes obtidas apresentam, em geral, inferior qualidade mecânica. Alguns exemplos de biopolímeros a partir dos quais foram desenvolvidas nanofibras por electrospinning são: quitosano (Duan *et al.* 2004; Min *et al.* 2004; Ohkawa *et al.* 2004; Park *et al.* 2004; Spasova *et al.* 2004; Geng *et al.* 2005; Subramanian *et al.* 2005; Li & Hsieh 2006), colagénio (Matthews *et al.* 2002; Matthews *et al.* 2003; Buttafoco *et al.* 2006; Rho *et al.* 2006), gelatina (Ki *et al.* 2005; Li *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006), seda (Ohgo *et al.* 2003), alginato (Bhattarai *et al.* 2006), proteína da membrana do ovo (Yi *et al.* 2004), caseína (Xie & Hsieh 2003), proteína de trigo (Woerdeman *et al.* 2005) e dextrano (Jiang *et al.* 2004). Em relação aos polímeros sintéticos destacam-se o poli(tereftalato de etileno) (PET) (Ma *et al.* 2005), o poliestireno (Wannatong *et al.* 2004) e o álcool polivinílico (Ding *et al.* 2002).

As matrizes produzidas por electrospinning possuem uma série de características que as tornam atractivas para a tecnologia de separação, tais como a elevada porosidade, o reduzido tamanho dos poros e a sua disposição interconectada e a elevada razão superfície/volume (Gopal *et al.* 2006). No entanto, outro pré-requisito indispensável para uma membrana de filtração é a elevada resistência mecânica, especialmente no caso da filtração de líquidos que requer muitas vezes a aplicação de pressões elevadas. A escassez de estudos de optimização e caracterização de propriedades mecânicas de matrizes

produzidas por electrospinning constitui uma grande limitação para a aplicação das matrizes como membrana de filtração. Assim, o desenvolvimento de um sistema que satisfaça estas características, bem como a sua caracterização, é um passo fundamental para o avanço desta nova tecnologia.

O poli(tereftalato de etileno) é um polímero linear utilizado em variadas aplicações sob a forma de filme, fibra ou plástico. Este polímero apresenta uma boa resistência mecânica, mesmo quando sujeito a temperaturas elevadas (até 175°C) e é utilizado em larga escala pela indústria têxtil e de embalagens, sendo uma matéria-prima de baixo custo e fácil acessibilidade. Como não apresenta toxicidade, o PET é utilizado como material de contacto com alimentos e tem ainda a vantagem de poder ser reciclado e reutilizado (Kim *et al.* 2000; Singh *et al.* 2004). Por essas características o PET parece ser uma matéria-prima adequada para produção de membranas de filtração por electrospinning.

### **1.1.2. Parâmetros que influenciam o processo de electrospinning**

Existem vários parâmetros que podem afectar a morfologia e as propriedades das fibras obtidas por electrospinning. Estes parâmetros podem ser divididos em três grupos: propriedades intrínsecas da solução (viscosidade, concentração do polímero, massa molecular do polímero, condutividade, constante dielétrica, elasticidade e tensão superficial), condições operacionais (voltagem aplicada, distância entre a agulha e o colector, velocidade do fluxo e diâmetro da seringa) e condições ambientais (temperatura, humidade e pressão atmosférica) (Tan *et al.* 2005).

Vários estudos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a influência destes parâmetros no processo de electrospinning e nas características das nanofibras (Theron *et al.* 2004; Tan *et al.* 2005; Yang *et al.* 2006). Destes estudos resultaram importantes conclusões que permitem uma compreensão mais aprofundada do processo e são deste modo importantes para a criação de novos sistemas de electrospinning. No entanto, o efeito dos diferentes parâmetros está fortemente ligado ao sistema polímero/solvente em estudo e é difícil extrapolar as conclusões para um sistema diferente. Assim, o desenvolvimento do sistema de electrospinning para um novo sistema polímero/solvente implica sempre uma etapa de optimização dos parâmetros, de modo a se obterem nanofibras com as características pretendidas. O grande número de parâmetros envolvidos e a

interdependência existente entre eles torna o processo de optimização difícil e demorado. A compreensão do modo como estes parâmetros actuam pode facilitar este processo. De seguida é feita uma breve abordagem acerca dos parâmetros influentes no processo de electrospinning.

### **1.1.2.1. Propriedades da solução**

#### ***Efeito da viscosidade***

Quando o jacto sai da agulha, a solução polimérica é estirada enquanto se dirige para o colector. É necessário haver um “cruzamento” suficientemente elevado entre as moléculas do polímero para que não ocorra quebra do filamento. Este envolvimento entre as moléculas depende essencialmente da concentração e massa molecular do polímero. A viscosidade de uma solução aumenta com o aumento da concentração do polímero e com o aumento da sua massa molecular. A combinação destes dois factores é determinante para o sucesso do electrospinning. Assim, à medida que a viscosidade aumenta, a forma adquirida pelo jacto da solução passa de pequenas gotas esféricas para gotas mais esticadas até atingir um valor mínimo que suporta um estiramento contínuo, originando um filamento uniforme. A partir desse valor o aumento da concentração irá provocar um aumento do diâmetro das fibras devido ao aumento do número de moléculas que passam simultaneamente pela agulha e sofrem um estiramento, durante a aplicação da diferença de potencial. No entanto uma viscosidade excessivamente elevada pode dificultar a saída da solução da agulha e a trajectória do jacto até ao colector (Ramakrishna *et al.* 2005).

#### ***Efeito da tensão superficial***

As moléculas de um líquido estão sujeitas a forças de atracção por parte das moléculas vizinhas que se anulam por serem exercidas em todas as direcções. No entanto, tal não ocorre com as moléculas que se encontram à superfície de um líquido, em que a atracção ocorre apenas no sentido do interior do líquido, originando deste modo um excesso de energia associado às moléculas superficiais, o qual se traduz na existência de tensão superficial. Existe, portanto, uma tendência de contracção da superfície do líquido

de modo a reduzir ao máximo a sua superfície de contacto com uma outra fase, por exemplo, o ar.

No processo de electrospinning o efeito da tensão superficial é bastante importante, visto que o processo envolve um grande aumento da área superficial de um material. Uma tensão superficial elevada promove a redução da superfície de contacto da solução com o ar o que origina, neste processo, um aumento do diâmetro das fibras ou mesmo a formação de agregados esféricos. Assim, o valor da tensão superficial da solução sujeita a electrospinning será determinante para o êxito do processo (Ramakrishna *et al.* 2005).

### ***Efeito da condutividade e da constante dielétrica do solvente***

A condutividade e a constante dielétrica do solvente influenciam o modo como a solução se comporta por acção da diferença de potencial

No processo de electrospinning a formação de fibras ocorre devido ao estiramento da solução polimérica causado pela aplicação de uma elevada diferença de potencial. Quanto maior for a condutividade, maior será a repulsão das cargas superficiais, ou seja, maior será o estiramento e menor será o diâmetro das fibras e o número de aglomerados esféricos. A constante dielétrica da solução parece ter uma influência semelhante à condutividade. De um modo geral, uma solução com maior constante dielétrica produzirá fibras com menor diâmetro e menor número de aglomerados (Ramakrishna *et al.* 2005).

### **1.1.2.2. Condições operacionais**

#### ***Voltagem aplicada***

A aplicação da diferença de potencial à solução polimérica é o princípio fundamental da técnica de electrospinning. É a diferença de potencial que irá causar o estiramento do jacto e a formação da fibra. Para um dado sistema polímero/solvente existe um valor mínimo de diferença de potencial a partir do qual ocorre a formação de fibra. A partir deste valor, à medida que a voltagem aplicada aumenta, ocorre maior estiramento do jacto, o que leva à obtenção de fibras de menor diâmetro. Outro efeito observado com o aumento da diferença de potencial é o alargamento da distribuição de diâmetros das fibras.

Este efeito é devido a formação de jactos secundários e é mais sentido no caso das soluções menos viscosas. Em determinados casos uma voltagem excessivamente elevada pode mesmo levar à instabilidade do processo (Tan *et al.* 2005).

### ***Fluxo da solução***

O fluxo da solução irá determinar a quantidade de polímero disponível para a formação de fibra. O aumento do fluxo da solução promove portanto o aumento do diâmetro da fibra. Porém, se o aumento for demasiado elevado ocorre formação de aglomerados esféricos e fusão de fibras por evaporação incompleta do solvente (Yuan *et al.* 2004; Ramakrishna *et al.* 2005).

### ***Distância agulha-colector***

Durante o tempo de voo entre a agulha e o colector é necessário que o solvente evapore para que ocorra formação da fibra. Assim, a distância entre a agulha e o colector deve ser suficiente para evaporação completa do solvente. A distância necessária para que isto aconteça dependerá em grande parte do ponto de ebulição do solvente. A evaporação incompleta do solvente poderá causar fusão de fibras e formação de aglomerados. Estudos realizados por Buchko *et al.* demonstram este efeito no electrospinning de soluções de proteína (Buchko *et al.* 1999). No entanto, Yang *et al.* refere que o aumento da distância agulha-colector não demonstrou melhorar a evaporação do solvente na produção de matrizes de óxido de polietileno. De acordo com estes autores, o principal efeito do aumento da distância agulha-colector é a redução da força do campo magnético e tem como consequência os efeitos causados pela diminuição da voltagem aplicada (Yang *et al.* 2006). Estes resultados comprovam novamente a forte dependência entre os parâmetros do electrospinning e sistema polímero/solvente.

## 1.2. Materiais e métodos

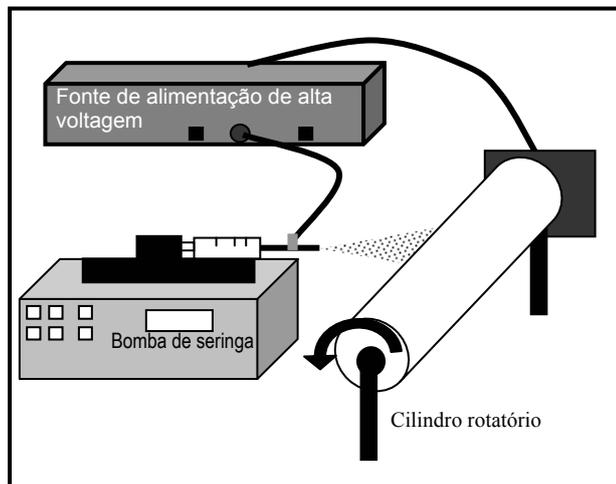
### 1.2.1. Amostras

- Poli(tereftalato de etileno) (PET): Utilizou-se PET na forma de pastilhas, gentilmente fornecidas pela Flexitex (São João da Madeira, Portugal).

### 1.2.2. Sistema de electrospinning

O sistema de electrospinning utilizado em todos os ensaios é constituído pelas seguintes componentes (Figura 1.1):

- Bomba de seringa Harvard Apparatus PHD 2000, com suporte para duas seringas e fluxo controlável entre 0,0001  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 220,82  $\text{mL}/\text{min}$ ;



**Figura 1.1** – Representação esquemática do sistema de electrospinning utilizado.

- Fonte de alta voltagem Spellman CZE 1000R, com diferenças de potencial variável entre 0 e 30 kV e corrente contínua entre 0 e 300  $\mu\text{A}$ ;

- Cilindro de alumínio rotatório (diâmetro 10 cm), ligado a um motor Siemens equipado com um variador de velocidade (velocidade controlada entre 0 e 3200 RPM);

- Seringa de plástico (10 mL) equipada com uma agulha de metal Kel-F hub (Hamilton), calibre 17, estilo de ponta nº 3.

### **1.2.3. Preparação das soluções para electrospinning**

As misturas de solventes (TFA e DCM) foram feitas por adição de volumes exactos dos solventes, seguida de agitação. As soluções foram preparadas dissolvendo a massa exacta de polímero no solvente ou mistura de solventes, sob agitação. Todas as soluções foram utilizada num período de tempo máximo de 2 horas após dissolução completa do polímero.

### **1.2.4. Optimização dos parâmetros operacionais do sistema de electrospinning**

Para a escolha das condições operacionais do electrospinning, efectuaram-se diferentes ensaios variando a voltagem aplicada, a velocidade de rotação do colector, a distância agulha-colector e a velocidade de fluxo da solução, conforme descrito de seguida:

- Voltagem aplicada: 15, 20, 26 e 30 kV;
- Velocidade de rotação do colector: 0, 300, 900 e 1500 RPM;
- Distância seringa colector: 5, 10, 12 e 15 cm;
- Fluxo da solução: 0.05, 0.2, 0.4, 0.6 mL/min.

Estes ensaios foram realizados a partir de uma solução de PET 30% (m/V) em TFA/DCM 70:30 (V/V). A escolha dos valores “ideais” para cada parâmetro foi feita com base numa análise macroscópica e microscópica da matriz. Estes valores foram utilizados nos ensaios que se seguem.

### **1.2.5. Estudo do efeito da variação da concentração de PET e da composição do solvente**

Concentrações crescentes de PET (10%, 20% e 30% m/V) foram dissolvidas em diferentes misturas de TFA e DCM (TFA/DCM = 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 e 100:0 V/V). Estas soluções foram transferidas para uma seringa de 10 mL equipada com uma agulha de metal. A velocidade de fluxo da solução durante o processo de electrospinning foi mantida 0,2 mL/min. Aplicou-se uma diferença de potencial de 26 kV.

As fibras foram recolhidas no colector cilíndrico, colocado a 12 cm da ponta da agulha, com uma velocidade de rotação de 900 RPM. Foram utilizados dois métodos de recolha de fibras:

- 1) Directamente numa lamela colada ao cilindro, para observação por microscopia óptica (MO);
- 2) Sobre a forma de matriz, que foi então cuidadosamente retirada do colector e seca na estufa a 35°C durante 12 horas; estas matrizes foram utilizadas para as caracterizações por microscopia de varrimento electrónico (SEM).

### **1.2.6. Caracterização morfológica das matrizes**

A morfologia das fibras das diferentes matrizes foi analisada por microscopia óptica (Olympus BX 51) e por microscopia de varrimento electrónico (ESEM Philips XL 30), após revestimento com ouro (Biorad SEM coating system SC502).

A análise da distribuição de diâmetros das fibras foi efectuada a partir de medições dos diâmetros, através de um programa de análise de imagem (Image J 1.37c). Para cada amostra efectuou-se a determinação do diâmetro de 300 fibras, de forma a traçar os gráficos com a respectiva distribuição para cada amostra.

## **1.3. Resultados e discussão**

De modo a otimizar as condições experimentais de obtenção das matrizes de PET foram estudados diversas variáveis do processo de electrospinning. A optimização das condições operacionais do sistema de electrospinning e das propriedades de solução foram feitas em paralelo, uma vez que estas variáveis dependem sempre uma da outra.

Relativamente às propriedades de solução, efectuou-se um estudo mais aprofundado do efeito da composição do solvente e da concentração de polímero, uma vez que estes dois parâmetros têm uma influência determinante sob as restantes propriedades da solução nomeadamente a viscosidade, condutividade, constante dieléctrica e tensão superficial e, conseqüentemente, sobre as características da matriz obtida.

### **1.3.1. Condições operacionais do electrospinning**

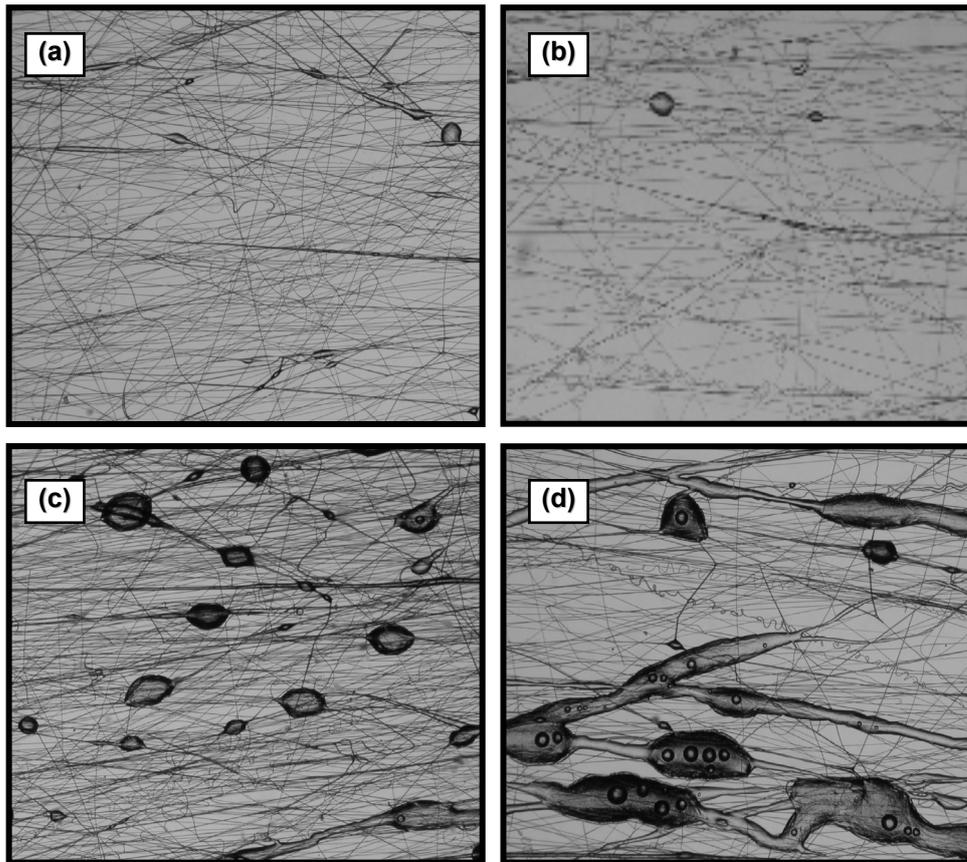
Durante a configuração de sistema de electrospinning é necessário analisar uma série de parâmetros experimentais que irão influenciar o processo de obtenção das nanomatrizes e consequentemente as suas características. Foi feita a análise dos parâmetros mais importantes, sendo este o fluxo da solução, a distância entre a agulha e o colector, a diferença de potencial aplicada e a velocidade de rotação do colector. A escolha destes parâmetros depende sempre do sistema polímero/ solvente em questão.

#### **1.3.1.1. Fluxo da solução**

O valor do fluxo da solução deve corresponder ao valor máximo para o qual se obtém uma matriz com as características fibrosas pretendidas, isto é, com ausência de aglomerados esféricos, de modo a obter uma eficiência máxima do processo. Para determinar este valor, foi feito um estudo da variação das características morfológicas das fibras para diferentes fluxos de solução.

Na figura 1.2 estão representadas algumas das imagens utilizadas no estudo da influência do fluxo da solução. A análise microscópica das matrizes permitiu verificar que um aumento de 0,05 mL/min para 0,2 mL/min não provoca um aumento do número de aglomerados. No entanto, quando o fluxo aumenta para 0,4 mL/min e 0,6 mL/min, verifica-se o aparecimento de aglomerados. Este facto mostra que existe um limite de massa de polímero para a qual o sistema de electrospinning é capaz de provocar um estiramento. Assim, quando este valor é ultrapassado, existe uma massa de polímero que não sofre estiramento e se deposita na forma de aglomerado.

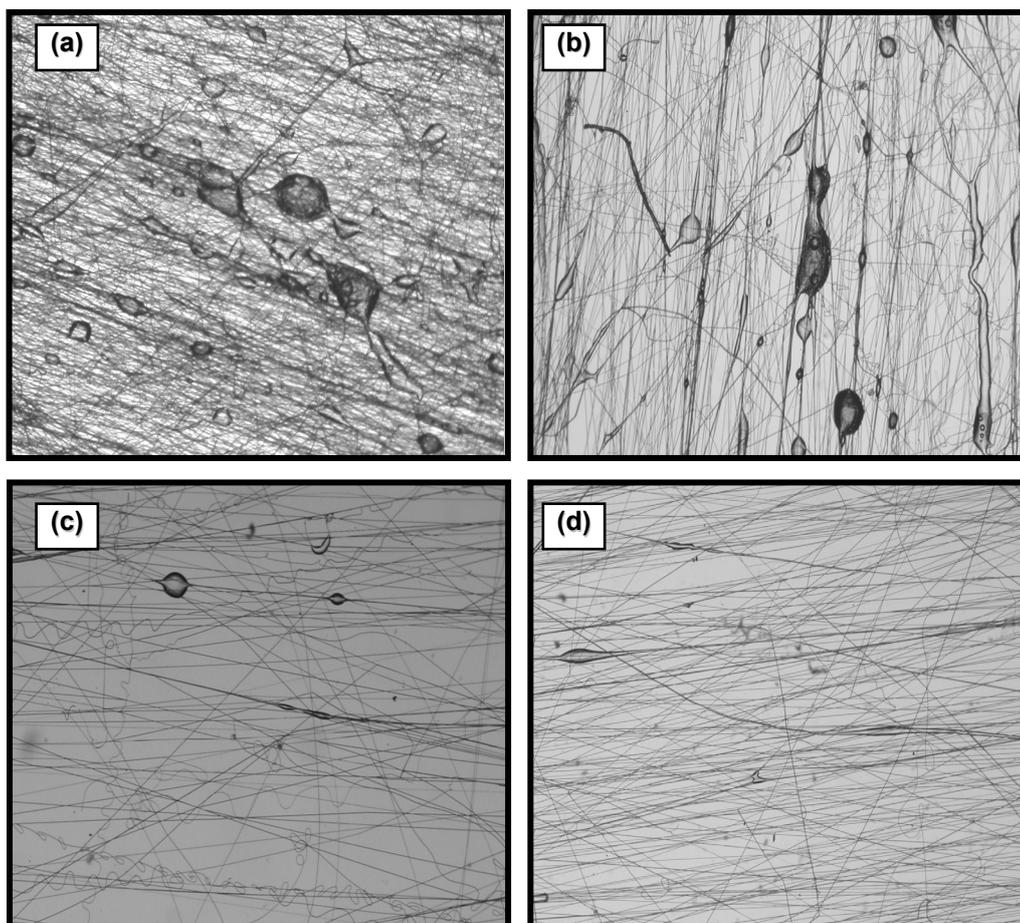
Outro factor que contribui para o aumento do número de aglomerados é a incompleta evaporação de solvente, para fluxos superiores a 0,2 mL/min. Desta forma parte do polímero atinge o colector ainda em solução, não ocorrendo neste caso formação de fibra.



**Figura 1.2** – Imagens de MO (ampliação 50X) das matrizes obtidas por electrospinning de soluções de PET 30% (m/V) em TFA/DCM 70:30 (V/V) com fluxo de solução variáveis: (a) 0,05 mL/min (b) 0,2 mL/min (c) 0,4 mL/min (d) 0,6 mL/min.

### 1.3.1.2. Distância agulha-colector

Durante a trajetória entre a agulha e o colector é necessário que ocorra evaporação completa do solvente para a formação de fibra. Assim, a distância óptima entre a agulha e o colector depende essencialmente do ponto de ebulição do solvente e corresponde à distância mínima para a qual o solvente não atinge o colector na fase líquida. Distâncias superiores levam a maiores perdas de polímero por deposição fora do colector e implicam a utilização de diferenças de potencial superiores. A escolha da distância ideal entre a agulha e o colector foi feita com base em imagens microscópicas das nanomatrizes obtidas variando este factor. Na figura 1.3 estão ilustradas algumas imagens representativas deste efeito.



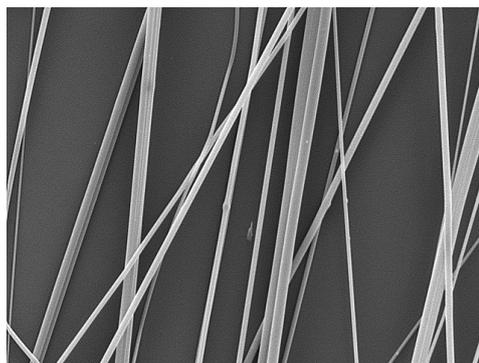
**Figura 1.3** – Imagens de MO (ampliação 50X) das matrizes obtidas por electrospinning de soluções de PET 30% (m/V) em TFA/DCM 70:30 (V/V) com distância agulha-colector variáveis: (a) 5 cm (b) 10 cm (c) 12 cm (d) 15 cm.

As imagens mostram a presença de aglomerados poliméricos para uma distância agulha-colector igual ou inferior a 10 cm. Isso deve-se ao facto do solvente não se evaporar completamente nestas distâncias. No entanto, para uma distância superior a 12 cm esse efeito é praticamente eliminado, sendo esta a distância de trabalho escolhida para os futuros ensaios.

### **1.3.1.3. Velocidade de rotação do colector**

Os efeitos da variação da velocidade de rotação do tubo colector ocorrem principalmente ao nível do alinhamento das fibras e conseqüentemente na sua estrutura

porosa. Velocidades muito elevadas levam ao alinhamento das fibras, o que não é pretendido para uma membrana de filtração (figura 1.4). No entanto, velocidades demasiado baixas provocam uma menor uniformidade da membrana, uma vez que as fibras formadas vão se sobrepondo de forma mais aleatória e irregular. Com base nas características morfológicas das matrizes, tanto ao nível macroscópico como microscópico, considerou-se que a velocidade de rotação ideal para a aplicação pretendida era de 900 RPM.



**Figura 1.4** – Imagem obtida por SEM da matriz de PET 30% (m/V) em TFA/DCM 70:30 (V/V) com velocidade de rotação do cilindro de 1500 RPM

#### **1.3.1.4. Diferença de potencial aplicada**

Como já foi referido, a aplicação de uma elevada diferença de potencial na solução polimérica provoca um estiramento das moléculas do polímero e a sua disposição na forma de fibra. Desta forma, existe um valor limite a partir do qual o estiramento é suficiente para a formação de fibra. Este valor depende das propriedades do sistema polímero/ solvente, nomeadamente da condutividade, tensão superficial e concentração da solução. Este valor aumenta proporcionalmente com a distância agulha-colector.

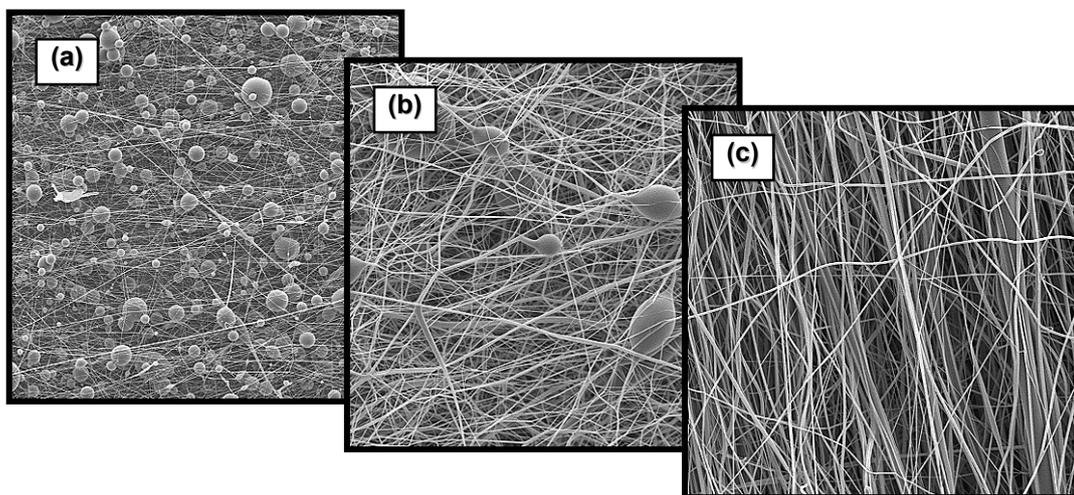
Para as condições experimentais utilizadas verificou-se a formação de fibras para um valor mínimo de 15 kV. Aumentando ainda esse valor, verificou-se um aumento da estabilidade do jacto e maior direccionamento das fibras para o colector (e consequentemente menores perdas de polímero) até ao valor de 26 kV. A partir desse valor, verificou-se um aumento da instabilidade do processo e sucessivas quebras na corrente. O valor de 26 kV mostrou ser, portanto, o valor ideal de voltagem aplicada para o sistema em estudo.

#### **1.3.2. Propriedades da solução**

##### **1.3.2.1. Efeito da variação da concentração**

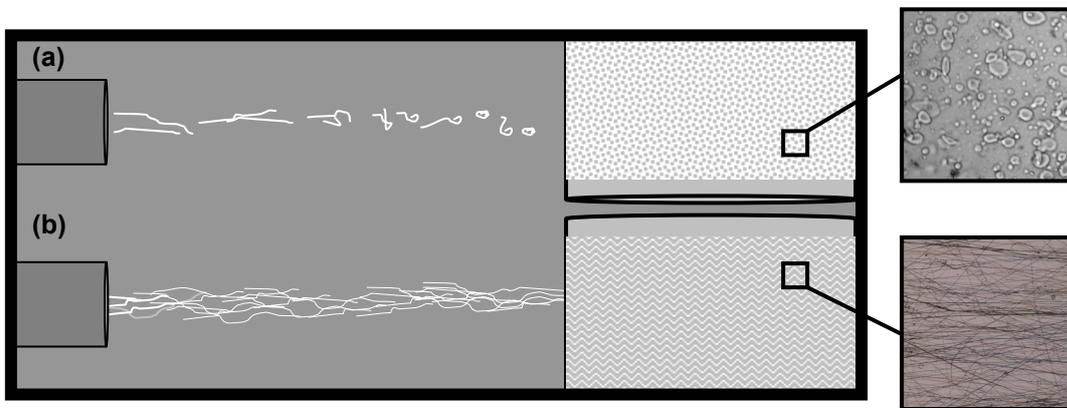
De forma a estudar a influência da concentração de PET na formação de fibras, prepararam-se soluções com concentrações crescentes de polímero em diferentes proporções de TFA/DCM, as quais foram então submetidas a electrospinning. Para uma concentração de polímero inferior a 10% (m/V) verificou-se apenas a deposição de pequenas gotas na superfície do colector. A partir desta concentração iniciou-se a formação de fibras e observou-se a formação de uma matriz na superfície do colector. À medida que a concentração de PET aumentava, verificou-se que a matriz formada se tornava progressivamente mais uniforme, resistente e com menos falhas, o que demonstra um melhoramento no processo de electrospinning com o aumento da concentração de polímero de 10% até 30% (m/V), para todas as proporções de TFA/DCM estudadas.

As imagens obtidas por microscopia de varrimento electrónico explicam essa melhoria na qualidade das matrizes com o aumento da concentração. Para concentrações próximas da concentração limite da formação de fibras (10% m/V) é possível observar a presença de algumas fibras. No entanto, encontram-se também presentes aglomerados poliméricos, na forma de gotículas, ou seja, porções de polímero que não foram estiradas (figura 1.5a). À medida que a concentração de polímero aumenta as fibras tornam-se predominantes aumentando assim a qualidade fibrosa da matriz até se chegar ao limite de solubilidade do PET para estes sistemas, o qual é de ~30 % m/V.



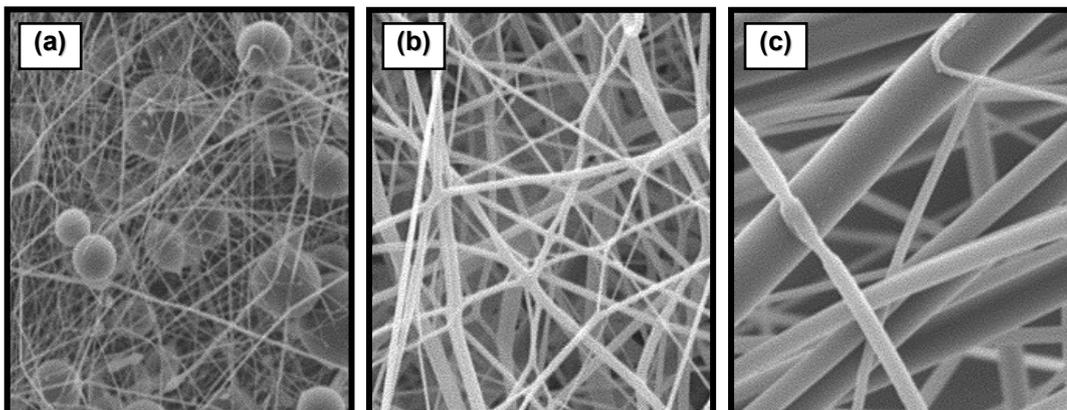
**Figura 1.5** – Imagem SEM (ampliação 500X) das matrizes obtidas a partir de soluções com concentrações crescentes de PET em TFA/DCM 70:30 (V/V): (a) 10%, (b) 20%, (c) 30% (m/V).

Teoricamente, existe uma concentração mínima de polímero necessária para a formação da fibra ( $C_L$ ). Enquanto esta concentração não for atingida o processo de electrospinning resulta apenas na formação de pequenas gotas (figura 1.6a). Tal acontece pois durante o processo de electrospinning, quando o jacto sai da agulha, a solução polimérica é estirada enquanto se dirige para o colector, sendo necessário haver um “entre-cruzamento” suficientemente elevado entre as moléculas do polímero para que não ocorra quebra do filamento (figura 1.6b). Este entre-cruzamento entre as moléculas depende principalmente da concentração do polímero.



**Figura 1.6** – Diagrama esquemático da trajetória do jacto durante o electrospinning (a) concentração de polímero  $< C_L$  (b) concentração de polímero  $> C_L$ .

A concentração do polímero tem também uma forte influência no diâmetro da fibra. Quando a concentração de polímero é mais elevada existe um maior número de moléculas alinhadas durante o estiramento e formação da fibra e, conseqüentemente, o seu diâmetro é maior. Este facto foi confirmado por microscopia de varrimento electrónico para os diferentes razões TFA/DCM. Na figura 1.7 estão representadas, como exemplo, as imagens obtidas por SEM das matrizes de PET em TFA/DCM 30:70 V/V.



**Figura 1.7** – Imagens SEM (ampliação 1500X) das matrizes obtidas a partir de soluções com concentrações crescentes de PET em TFA/DCM 30:70 (V/V): (a) 10%, (b) 20%, (c) 30% (m/V).

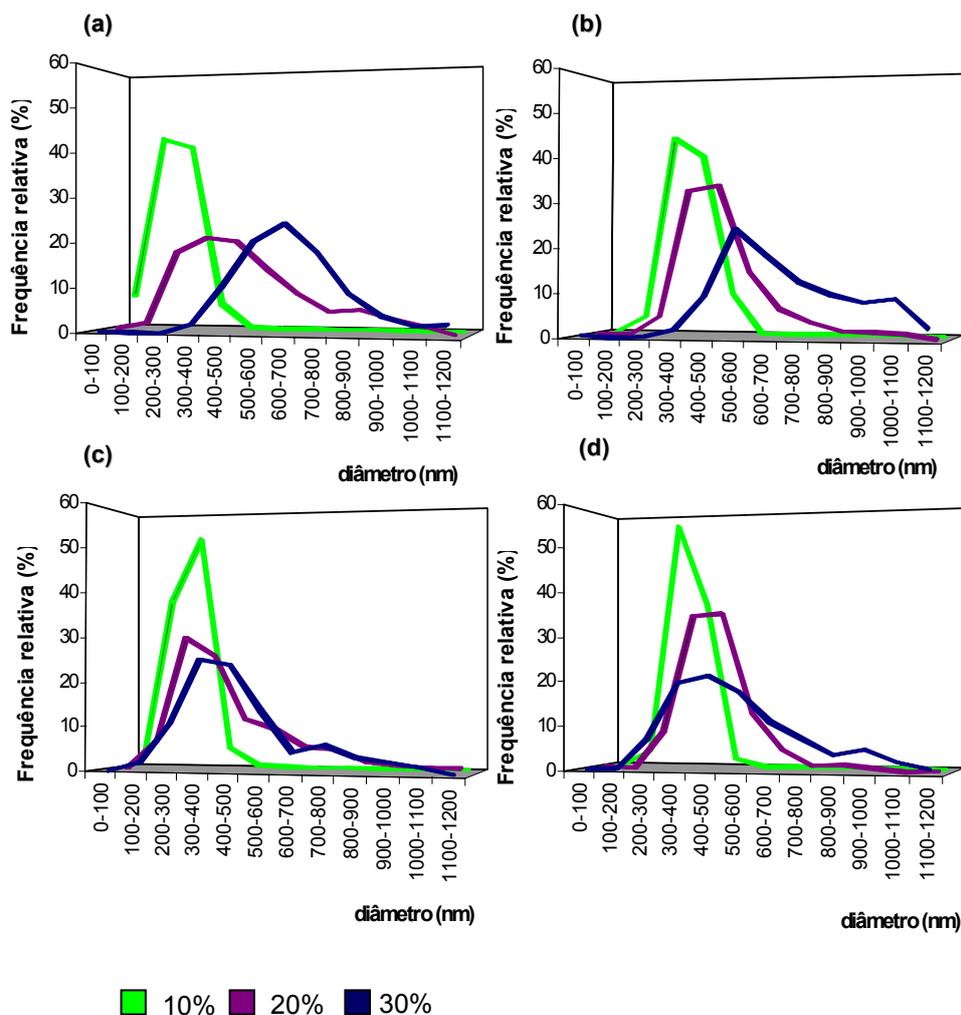
Este aumento de diâmetro pode ser traduzido graficamente após medição dos diâmetros das fibras, recorrendo a um programa de processamento de imagem (figura 1.8). A análise da distribuição de diâmetros permite concluir que, para todas as misturas de solvente analisadas (TFA/DCM: 30:70, 50:50, 70:30 e 100:0 V/V), o aumento da concentração PET provoca:

- 1) Aumento do diâmetro médio das fibras, sendo que este aumento é tanto mais sentido quanto menor é a proporção de TFA;
- 2) Alargamento da distribuição de diâmetros, ou seja, uma menor uniformidade de diâmetros na matriz de nanofibras.

O alargamento da distribuição de diâmetros não é um efeito desejado para uma membrana de filtração, visto que promove a heterogeneidade da matriz, nomeadamente ao nível do diâmetro dos poros. Esta heterogeneidade não compromete porém, a utilização da nanomatriz como membrana de filtração, pois a dimensão muito reduzida das suas fibras torna o número de poros muito elevado.

Assim, para uma molécula atravessar uma membrana com uma espessura de 0,5 mm e diâmetro médio das fibras de 500 nm terá que passar em média por mais de 1000 poros. Deste modo, uma maior heterogeneidade de diâmetros verificada nas matrizes de

PET 30% (m/V) é menos prejudicial do que a presença de aglomerados nas matrizes produzidas a partir de soluções menos concentradas. Tendo em conta todos esses factores determinou-se que o valor óptimo para a concentração de PET na solução sujeita a electrospinning corresponde ao seu valor próximo do máximo de solubilidade nestes sistemas de solventes: 30% (m/V).



**Figura 1.8** – Distribuição de diâmetros das fibras para diferentes concentrações de PET (10, 20 e 30% (m/V)) em TFA/DCM (V/V): (a) 30:70, (b) 50:50, (c) 70:30 e (d) 100:0.

### 1.3.2.2. Efeito do solvente

Como foi referido na introdução, estudos anteriores demonstraram que as propriedades do sistema de solventes desempenham um papel crucial na capacidade de

formação e morfologia das nanofibras obtidas por electrospinning. Desta forma, a variação da composição do sistema de solventes, por alteração da razão TFA/DCM, poderá resultar em alterações morfológicas das nanomatrizes. Para estudar estas possíveis modificações, foi feita uma manipulação da composição do sistema de solventes, com acompanhamento das mudanças morfológicas sofridas. Na tabela 1.1 estão representadas algumas propriedades físico-químicas dos solventes utilizados.

**Tabela 1.1** – Propriedades físico-químicas do TFA e do DCM

<b>Propriedade</b>	<b>TFA</b>	<b>DCM</b>
Constante dieléctrica (25°C)	42,1	8,9
Viscosidade mPa s (25°C)	0,81	0,41
Tensão Superficial (mN/m)	13,63	28,12
Pressão Vapor (Torr)	96	350
Ponto ebulição (°C)	71,8	39,8
Calor de vaporização (kJ/mol)	38,05	14,44

### ***Caracterização macroscópica das matrizes a 30%***

O primeiro facto verificado foi que, para este sistema de solventes (misturas de TFA e DCM), a dissolução de 30% de PET (m/V) apenas ocorre nos sistemas de solvente com concentração de TFA superiores a 30%. Assim, foi possível obter nanomatrizes a partir de soluções de PET 30% (m/V) em misturas com uma razão TFA/DCM entre 30:70 e 100:0 (V/V).

As matrizes provenientes das soluções com diferentes razões TFA/DCM apresentavam diferenças visíveis a olho nu. Verificou-se que quando a razão TFA/DCM aumentava, até uma razão de 70:30 (V/V), as matrizes formadas apresentavam maior largura e maior uniformidade de espessura, como se pode verificar na tabela 2. No entanto, ao utilizar-se TFA puro como solvente, verificou-se que o jacto formado era mais instável, o que levava a perdas de amostra por deposição no exterior do colector. Este aumento da instabilidade do jacto pode ser devido ao aumento da condutividade, verificado com o aumento da proporção de TFA.

**Tabela 1.2** – Dimensões das matrizes obtidas por electrospinning de 10 mL das soluções de PET 30% em diferentes razões de TFA/DCM.

<b>TFA/DCM (V/V)</b>	<b>Massa seca (g)</b>	<b>Largura (mm)</b>	<b>Espessura média no centro (mm)</b>	<b>Espessura média na extremidade (mm)</b>
<b>30:70</b>	0,432	80	0,011	0,001
<b>50:50</b>	0,655	230	0,050	0,010
<b>70:30</b>	0,653	240	0,060	0,030
<b>100:0</b>	0,559	210	0,060	0,010

Para verificar o que acontecia numa escala microscópica efectuou-se uma análise das matrizes por microscopia óptica e microscopia de varrimento electrónico.

#### ***Caracterização microscópica das matrizes a 30%***

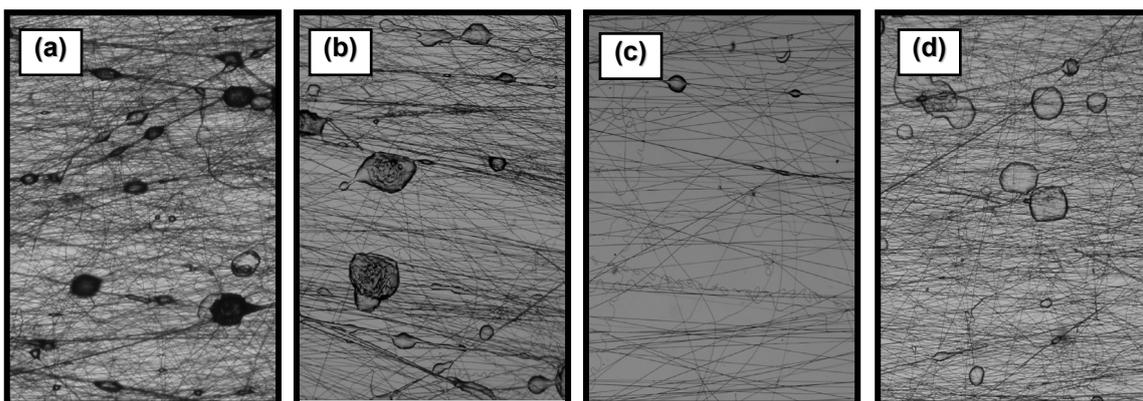
As imagens SEM das matrizes demonstraram que estas são constituídas por fibras não-orientadas, com diâmetros médios compreendidos entre os 500 nm e os 800 nm, e aglomerados poliméricos, mais ou menos esféricos. No entanto, a proporção do número de aglomerados presentes, bem como a distribuição de diâmetros das nanofibras varia para os diferentes sistemas de solventes.

A análise microscópica das matrizes revelou que a proporção de aglomerados diminui com o aumento da razão TFA/DCM até uma razão de 70:30 (V/V) (figura 1.9). Este aumento na capacidade de formação de fibras deve-se, principalmente, à diminuição da tensão superficial do sistema de solventes. Uma tensão superficial mais elevada opõe-se ao aumento da razão área/volume, promovendo no caso do electrospinning a formação de aglomerados em vez de fibras, uma vez que a sua área superficial é muito inferior. Assim, o aumento da área superficial é tanto mais fácil quanto menor for a tensão superficial do solvente.

A tensão superficial de uma mistura de solventes não é função directa da tensão superficial dos componentes puros. No caso de uma solução não aquosa, a tensão superficial de uma mistura pode ser aproximada pela fracção molar da tensão superficial dos componentes puros. Esta aproximação não pode porém ser feita para soluções aquosas,

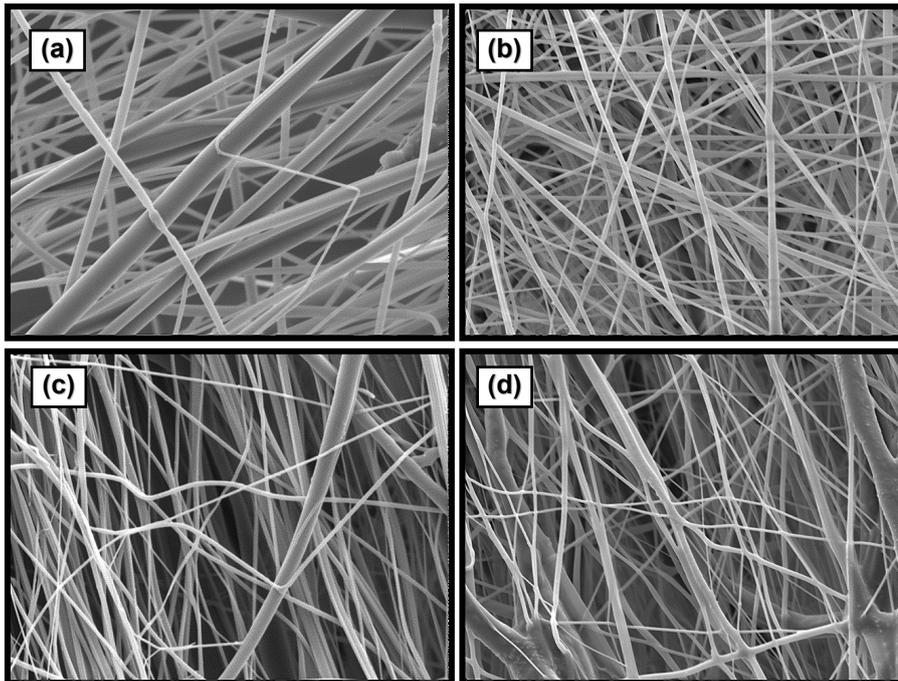
pois ao contrário das misturas de solventes orgânicos, existe um comportamento não-linear evidente (num sistema aquoso uma pequena quantidade de um solvente orgânico pode alterar significativamente o valor da tensão superficial) (Ramakrishna *et al.* 2005). Devido ao facto do sistema de solventes (TFA/DCM) ser muito corrosivo não foi possível efectuar um estudo da variação da tensão superficial em função da razão TFA/DCM. Assim, as conclusões feitas em relação ao aumento ou diminuição da tensão superficial foram baseadas numa média ponderada dos valores da tensão superficial dos solventes puros, visto tratarem-se de solventes não aquosos, considerando que a tensão superficial da mistura será tanto mais baixa quanto maior a proporção de TFA, aquele que puro apresenta a menor tensão superficial.

A volatilidade do sistema de solventes tem igualmente um efeito relevante em electrospinning, uma vez que a evaporação do solvente é um passo fundamental neste processo. Na presença de solvente as moléculas permanecem em solução e desta forma não ocorre formação de fibras. A evaporação incompleta do solvente durante o trajecto entre a agulha e o colector leva à ocorrência da formação de aglomerados poliméricos. O TFA é um solvente menos volátil que o DCM. Quando se utilizou TFA puro como solvente verificou-se a presença de aglomerados na matriz. A presença de DCM na solução promove o aumento da volatilidade do sistema, contribuindo deste modo para a diminuição do número de aglomerados. A matriz com melhor qualidade fibrosa é portanto a matriz obtida a partir da mistura de TFA/DCM 70:30 (V/V), como é possível constatar na figura 1.9.



**Figura 1.9** – Imagens obtidas por MO das fibras resultantes das soluções de PET 30% (m/V) em TFA/DCM (V/V): (a) 30:70 (b) 50:50 (c) 70:30 (d) 100:0 (ampliação total 50X).

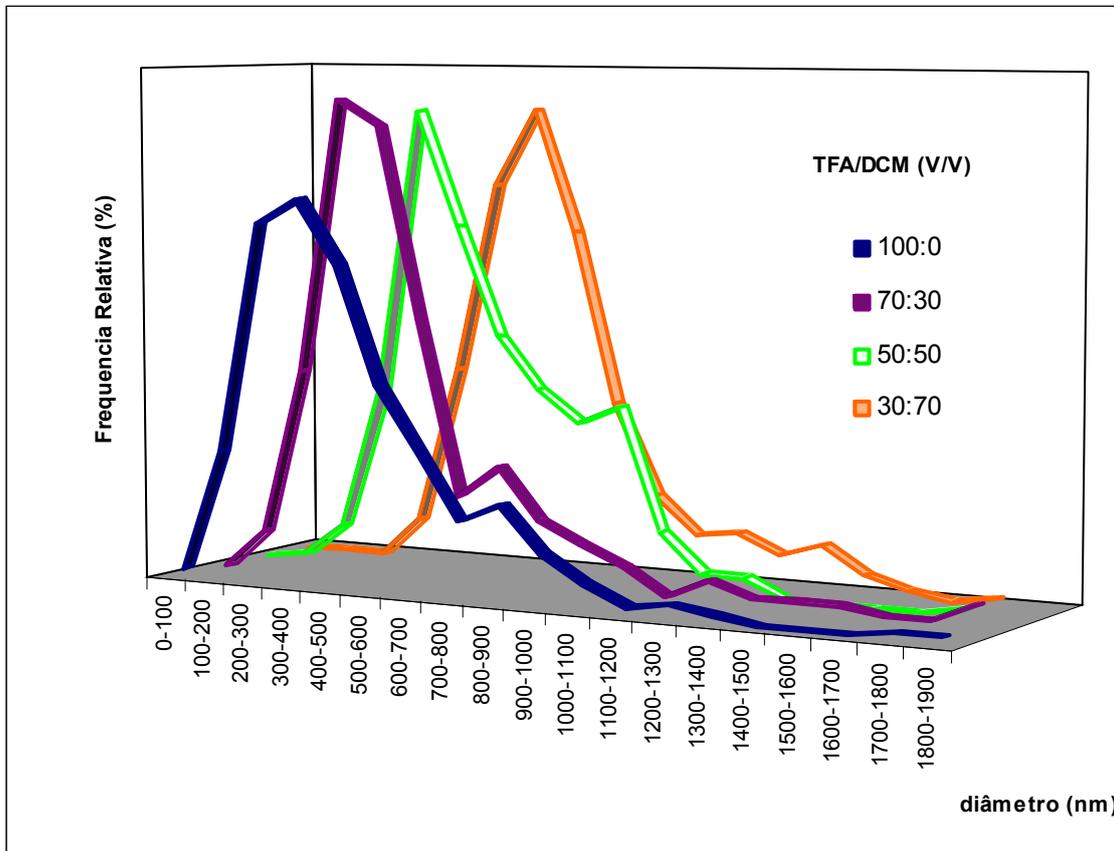
Uma observação mais ampliada das matrizes, recorrendo à microscopia electrónica, permitiu verificar um outro efeito resultante da baixa volatilidade do solvente: a fusão de fibras. Este efeito ocorre para concentrações de TFA mais elevadas (figura 1.10d) e é decorrente da chegada de solvente à nanomatriz, que provoca dissolução das fibras que já estão formadas e consequentemente o fenómeno de fusão.



**Figura 1.10** – Imagens SEM (ampliação 1500X) das matrizes obtidas a partir de soluções de PET 30% (m/V) em TFA/DCM (V/V): (a) 30:70 (b) 50:50 (c) 70:30 (d) 100:0.

A distribuição de diâmetros das fibras foi analisada por processamento das imagens obtidas por microscopia de varrimento electrónico e estão representadas na figura 1.11. Pela análise deste gráfico é possível concluir que o aumento da razão TFA/DCM promove uma diminuição do diâmetro das fibras obtidas. Esta variação relaciona-se, essencialmente, com a alteração de duas propriedades do sistema de solvente: a tensão superficial e a constante dieléctrica. A tensão superficial da mistura diminui com o aumento da razão TFA/DCM. Essa diminuição permite um maior aumento da razão área/volume durante o processo de electrospinning e consequentemente ocorre formação de fibras com menor diâmetro. Por outro lado, um solvente com uma maior constante dieléctrica, neste caso as misturas mais ricas em TFA, consegue transportar mais carga o que origina um maior

estiramento da fibra pela aplicação da diferença de potencial, e/ou a produção de um maior número de filamentos por aumento da repulsão electrostática. Estes dois factos contribuem assim para a formação de fibras mais finas, tal como foi observado, a medida que a proporção de TFA na mistura de solventes aumenta.



**Figura 1.11** – Distribuição de diâmetros das fibras para obtidas a partir de soluções de PET 30% (m/V) em TFA/DCM (V/V): (a) 30:70 (B) 50:50 (C) 70:30 (D) 100:0.

## **1.4. Conclusões**

Com base nas características morfológicas descritas anteriormente seleccionou-se a matriz obtida a partir da solução de 30% de PET (m/V) em TFA/DCM 70:30 (V/V) para trabalhar nos ensaios que se seguiram e que serão analisados nos capítulos seguintes, uma vez que esta matriz foi a que demonstrou apresentar melhor qualidade fibrosa (p. ex. menor número de aglomerados, fibras de diâmetro reduzido).

## **Capítulo 2**

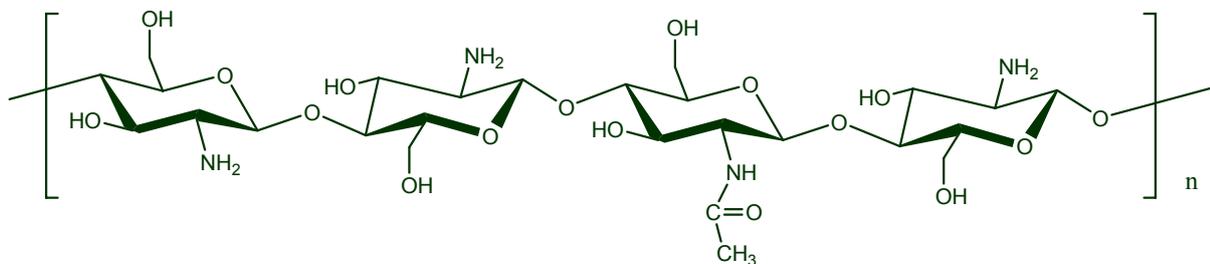
### **Desenvolvimento de nanofibras mistas de PET e quitosano**

## 2.1. Introdução

No capítulo anterior analisou-se o processo de obtenção de fibras de PET por electrospinning. No presente capítulo pretende-se introduzir no sistema um segundo polímero, o quitosano, de modo a obter fibras bicomponentes. Com esse objectivo, desenvolveu-se um estudo para avaliar as condições em que os polímeros são compatíveis em solução, bem como os efeitos da introdução do quitosano sobre as propriedades morfológicas, estruturais e mecânicas das matrizes.

### 2.1.1 Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo linear formado por uma cadeia de resíduos de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidos por ligações  $\beta$ -(1,4) (Figura 2.1). Nos últimos anos, este polímero tem sido alvo de grande interesse, uma vez que possui propriedades como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e actividade antimicrobiana. A sua aplicação tem sido amplamente estudada, nomeadamente na área biomédica, alimentar, têxtil, cosmética e no tratamento de efluentes (Dutta *et al.* 2002).



**Figura 2.1** – Representação esquemática da molécula de quitosano

### 2.1.2. Produção de nanofibras de quitosano por electrospinning

A obtenção de nanofibras de quitosano por electrospinning tem sido estudada por diversos autores. A produção de nanofibras de quitosano puro apenas foi conseguida por dissolução do quitosano em ácido trifluoracético (TFA) puro ou em ácido acético concentrado (90% V/V) (Ohkawa *et al.* 2004; Geng *et al.* 2005). No entanto, estas fibras

apresentam uma resistência mecânica muito baixa, o que limita a sua utilização em grande parte das aplicações. Por esse motivo, muitos autores têm desenvolvido fibras a partir da combinação do quitosano com outros polímeros, como é o caso do álcool polivinílico (Bhattarai *et al.* 2005; Li & Hsieh 2006; Lin *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2006), do óxido de polietileno (Duan *et al.* 2004; Spasova *et al.* 2004) e da seda (Park *et al.* 2004), por exemplo.

### **2.1.3. Termodinâmica da solubilidade de polímeros**

A termodinâmica de um processo de solubilização de um polímero é governada pela seguinte equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

onde,

$\Delta G$  = Variação da energia livre de Gibbs

$\Delta H$  = Variação da entalpia

$T$  = Temperatura absoluta do sistema

$\Delta S$  = Variação da entropia do processo.

Se a variação da energia livre de Gibbs for negativa ( $\Delta G < 0$ ) o processo será favorável e a dissolução ocorrerá. Como a temperatura absoluta do sistema durante a dissolução é um valor positivo, bem como a entropia, uma vez que as moléculas em solução estão dispostas de forma menos organizada que no estado sólido, o termo ( $-T\Delta S$ ) contribuirá sempre de forma positiva para o processo de dissolução. Relativamente à variação da entalpia ( $\Delta H$ ) poderão ocorrer duas situações: se o estado energético do polímero no estado sólido for inferior ao do polímero em solução a variação da entalpia será positiva ( $\Delta H > 0$ ). Caso o polímero apresente maior afinidade para as moléculas de solvente do que entre as suas próprias moléculas, devido ao estabelecimento de pontes de hidrogénio por exemplo, a variação da entalpia será negativa. Neste último caso a dissolução do polímero está assegurada. Caso a variação da entalpia seja positiva, é necessário fazer um balanço entre os factores entálpicos e entrópicos, sendo que se  $\Delta H < T\Delta S$  a dissolução ocorrerá.

Com a adição de um segundo polímero, a variação de entropia do processo de dissolução diminui, uma vez que existem um menor número de possibilidades conformacionais para as moléculas de cada polímero. Assim, o valor da entropia do sistema é muito reduzido e a dissolução apenas ocorrerá se a variação de entalpia do processo for negativa ou muito reduzida. Por esse motivo a dissolução de dois polímeros numa mesma solução é um fenómeno raro, mesmo quando a solubilidade de cada um dos polímeros no solvente é elevada. Assim, o que normalmente se verifica é uma separação total de fases ou uma co-solubilização parcial, em que a solução apresenta zonas mais ricas em um polímero e zonas mais ricas no outro polímero.

A massa molecular é um factor importante na solubilidade e compatibilidade dos polímeros. Quanto menor for a massa molecular do polímero ou dos polímeros em solução, maior serão as possibilidades de conformação das moléculas e, conseqüentemente, maior a sua entropia. Assim, a diminuição da massa molecular facilita o processo de dissolução de um ou mais polímeros num dado solvente (Rosen 1982).

#### **2.1.4. Diminuição da massa molecular do quitosano**

A diminuição da massa molecular do quitosano pode ser conseguida, por hidrólise química ou enzimática, dando origem a moléculas de inferior massa molecular e até mesmo a oligoquitosanos (Tommeraas 2001; Kittur *et al.* 2003; Kumar & Tharanathan 2004; Cabrera & Van Cutsem 2005). Como a diminuição da massa molecular pode facilitar a co-solubilização de polímeros, a obtenção deste tipo de compostos pode apresentar um elevado interesse neste trabalho.

## **2.2. Materiais e métodos**

### **2.2.1. Amostras**

- Quitosano: Amostra de quitosano comercial (Sigma) extraído da casca de caranguejo;
- Poli(tereftalato de etileno) (PET): Utilizou-se PET na forma de pastilhas, gentilmente fornecidas pela Flexitex (São João da Madeira, Portugal).

## **2.2.2. Preparação de amostras de quitosano com diferentes massas moleculares**

### **2.2.2.1. Hidrólise do quitosano com ácido nítrico**

A despolimerização do quitosano foi feita com base no método proposto por Tommeraas *et al* (Tommeraas 2001). Assim, preparou-se uma solução de quitosano em ácido acético 0,1 M e adicionou-se nitrito de sódio até atingir concentração pretendida de ácido nítrico. Foram efectuadas variações na concentração de quitosano, na concentração de ácido nítrico e no tempo de reacção. A reacção foi mantida sob atmosfera de azoto e com agitação constante. No fim da reacção adicionou-se NaOH 0,1 M até pH = 8, de modo a precipitar o quitosano hidrolisado, efectuando-se, de seguida, a sua separação por centrifugação a 10000 RPM durante 10 minutos a 10°C. O precipitado foi então lavado com uma mistura de água/ etanol 20:80 (V/V), até neutralização e de seguida com etanol absoluto e acetona. O quitosano obtido foi então seco na estufa, a 35°C, durante 12 horas.

### **2.2.2.2 Determinação da massa molecular das amostras de quitosano por cromatografia de permeação em gel (GPC)**

A análise por GPC foi realizada num aparelho PL-GPC 110 system (Polymer Laboratories Ltd, U.K.) equipado com uma pré-coluna Plaguagel-OH 15 µm e duas colunas em série Plaguagel-OH 40 (15 µm, 300x7,5 mm) e Plaguagel-OH 60 (15 µm, 300x7mm), e detector de índice de refração. O sistema de injeção e colunas foi mantido a 40 °C e o fluxo do eluente (tampão CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa 0,10M/0,10M) foi de 0,9 mL/min.

Para a avaliação das massas moleculares das amostras, foram preparadas soluções com concentração de 0,4 mg/mL. Todas as soluções foram filtradas com um filtro de 0,45 µm. As colunas foram calibradas com padrões de pululanos comerciais com massas moleculares (Mw) entre 738 e 48000 Da, construindo-se posteriormente a respectiva curva de calibração.

As massas moleculares (Mw) das amostras foram calculadas a partir dos tempos de retenção obtidos nos respectivos cromatogramas e da curva de calibração anteriormente determinada.

### **2.2.3. Estudo da compatibilidade (co-solubilidade) dos polímeros**

#### **2.2.3.1. PET e quitosano não hidrolisado (QO)**

Efectuaram-se diferentes procedimentos de forma a tentar obter uma solução de PET e quitosano comercial (QO) no sistema de solventes TFA/DCM. Todos os ensaios foram realizados em tubos “sovirel” de 1 ml (com agitação constante); os procedimentos realizados estão descritas na tabela 2.1. Todos os ensaios foram realizados para os seguintes sistemas de solventes: TFA/DCM 70:30, 80:20, 90:10 e 100:0 V/V.

**Tabela 2.1**– Etapas do ensaio de solubilização PET + quitosano

<b>1º Passo</b>	<b>2º Passo</b>	<b>3º Passo</b>
Solvente (TFA/DCM) 1 mL	Adição de quitosano (3%) m/V até dissolução completa	Adição gradual de PET
Solvente (TFA/DCM) 1 mL	Adição de PET (10%) m/V até dissolução completa	Adição gradual de quitosano
Solução de PET (3%) m/V em TFA/DCM (1 mL)	Adição de solução quitosano (2%) m/V em TFA/DCM gota a gota	...
Solução quitosano (2%) m/V em TFA/DCM (1 mL)	Adição de solução de PET (3%) m/V em TFA/DCM gota a gota	...

#### **2.2.3.2. PET e quitosano hidrolisado**

Os estudos de solubilidade foram realizados adicionando a concentração pretendida da amostra de quitosano (6% m/V) a 1 mL da mistura de solvente previamente preparada, sob agitação. Foram analisados os seguintes sistemas de solventes: TFA/DCM 70:30, 80:20, 90:10 e 100:0 V/V. Após dissolução completa do quitosano foi feita a adição de PET (30% m/V), sob agitação. Registaram-se os resultados observados.

#### **2.2.4. Preparação das soluções para electrospinning**

Com base nos resultados obtidos em § 2.2.3. seleccionaram-se as condições julgadas adequadas para co-solubilização de PET e quitosano num mesmo solvente. As

soluções foram preparadas dissolvendo a massa de quitosano pretendida em 20 mL de uma mistura de TFA/DCM 80:20 (V/V), sob agitação. Após dissolução completa do quitosano, foi feita a adição da massa de PET necessária para obter a concentração final de 30 % (m/V). Todas as soluções foram utilizadas num período de tempo máximo de 2 horas após dissolução completa dos polímeros. Na tabela seguinte estão identificadas as soluções preparadas e as respectivas concentrações de PET e quitosano.

**Tabela 2.2**– Identificação das soluções poliméricas

<b>Amostra</b>	<b>C<sub>PET</sub> % (m/V)</b>	<b>C<sub>quitosano</sub> % (m/V)</b>
<b>P</b>	30	0
<b>PQC2</b>	30	2
<b>PQC6</b>	30	6
<b>PQD2</b>	30	2
<b>PQD6</b>	30	6

### **2.2.5. Electrospinning das soluções**

Cada uma das soluções preparadas anteriormente (20mL) foi transferida para uma seringa de modo a ser submetida a electrospinning. A velocidade de fluxo da solução durante o processo de electrospinning foi mantida a 0,08 mL/min e a diferença de potencial aplicada foi de 26 kV. As fibras foram recolhidas no colector cilíndrico, colocado a 12 cm da ponta da agulha, com uma velocidade de rotação de 900 RPM. A matriz foi cuidadosamente retirada do colector e seca na estufa a 60°C durante 2 horas. A identificação atribuída a cada matriz corresponde a designação da respectiva solução que lhe deu origem (tabela 2.2).

### **2.2.6. Caracterização morfológica das matrizes**

A análise da morfologia e da distribuição de diâmetros das fibras das diferentes matrizes foi realizada conforme descrito anteriormente (§1.2.6)

### 2.2.7. Ensaio de solubilidade das matrizes

A solubilidade das matrizes em água e em solução tampão CH<sub>3</sub>COOH (0,2 M)/CH<sub>3</sub>COONa (0,2M) pH 3,8 (pH idêntico ao pH do sumo de maçã), foi testada de duas formas:

- 1) Para cada matriz recortou-se um pequeno disco (diâmetro 1 cm), o qual foi submerso em 50 mL de água ou solução tampão. Após 96 horas, o disco foi retirado e seco numa estufa a 60°C durante 2 horas.
- 2) Para cada matriz recortou-se um círculo com 63,4 mm de diâmetro. Introduziu-se a matriz num sistema de filtração MILIPORE “Stirred Ultrafiltration Cells”(8200). Recorrendo a este sistema, filtraram-se através da matriz 150 mL de solvente (água ou solução tampão), com agitação constante e sob pressão directa de azoto (0,05 bar). Seguidamente, a matriz foi seca numa estufa a 60°C durante 2 horas.

As possíveis alterações das matrizes causadas por estes tratamentos foram avaliadas por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e por SEM.

Na tabela 2.3 estão representadas as designações atribuídas às amostras submetidas aos ensaios de solubilidade.

**Tabela 2.3** – Identificação das amostras dos ensaios de solubilidade

Identificação da amostra	Sem tratamento	Solubilidade em tampão pH=3.8			
		Solubilidade em água		Imersão (96h)	Filtração
		Imersão (96h)	Filtração		
P	P (H <sub>2</sub> O-96h)	P (H <sub>2</sub> O-F)	P (3.8-96h)	P (3.8-F)	
PQC2	PQC2 (H <sub>2</sub> O-96h)	PQC2 (H <sub>2</sub> O-F)	PQC2 (3.8-96h)	PQC2 (3.8-F)	
PQC6	PQC6 (H <sub>2</sub> O-96h)	PQC6 (H <sub>2</sub> O-F)	PQC6 (3.8-96h)	PQC6 (3.8-F)	
PQD2	PQD2 (H <sub>2</sub> O-96h)	PQD2 (H <sub>2</sub> O-F)	PQD2 (3.8-96h)	PQD2 (3.8-F)	
PQD6	PQD6 (H <sub>2</sub> O-96h)	PQD6 (H <sub>2</sub> O-F)	PQD6 (3.8-96h)	PQD6 (3.8-F)	

### **2.2.8. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros foram adquiridos num espectrómetro com sistema de ATR (Bruker IFS 55 Golden Gate) na gama de número de onda entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e uma acumulação de 128 scans. As amostras foram analisadas em triplicado.

### **2.2.9. Caracterização de propriedades mecânicas das matrizes**

Cortaram-se diversas tiras de cada matriz anteriormente obtida, com dimensões semelhantes (aproximadamente 90 x 10 x 0,4 mm). As dimensões exactas de cada tira foram determinadas efectuando medições do comprimento, largura e espessura (média de 7 medições) com um micrómetro Mitutoyo.

Realizaram-se ensaios de tensão uniaxial com um texturómetro (modelo TA.Hdi, Stable Micro Systems, England), determinando-se os parâmetros de alongamento e tensão máxima de ruptura. Efectuaram-se 3 réplicas para cada amostra.

## **2.3. Resultados e discussão**

### **2.3.1. Compatibilidade dos polímeros (PET + quitosano)**

#### **2.3.1.1. Quitosano de massa molecular elevada**

Efectuaram-se diferentes procedimentos de forma a tentar obter uma solução de PET e quitosano no sistema de solventes TFA/DCM. No entanto, em nenhum dos ensaios foi possível dissolver numa mesma solução os dois tipos de polímero (quitosano e PET). Verificou-se que a adição de quitosano (mesmo para concentrações muito baixas) à solução de PET (e vice-versa) provoca precipitação dos polímeros.

Como foi referido na introdução, a solubilização de dois polímeros em um mesmo solvente, na maior parte dos casos, não é um processo termodinamicamente viável. A dissolução de quitosano de elevada massa molecular e PET em TFA/DCM mostrou ser um destes casos. Concluiu-se então que estes polímeros são incompatíveis, mesmo em concentrações muito baixas, no sistema de solvente TFA/DCM.

De forma a tentar encontrar uma condição de co-solubilidade entre os dois polímeros, procedeu-se à hidrólise do quitosano, com vista à obtenção de amostras de quitosano com inferior massa molecular.

### **2.3.1.2. Quitosano hidrolisado**

#### **2.3.1.2.1. Hidrólise do quitosano e caracterização das amostras obtidas**

O processo de hidrólise ácida do quitosano foi realizado a partir da amostra de quitosano comercial com elevada massa molecular. Através da manipulação da concentração de ácido nítrico e do tempo de reacção é possível manipular a extensão da hidrólise e obter, desta forma, amostras de quitosano com diferentes massas moleculares.

A determinação da massa molecular das amostras de quitosano foi efectuada por GPC. Na tabela 2.4 encontram-se sumariados os valores obtidos para as massas moleculares das amostras de quitosano obtidas em diferentes condições de reacção de hidrólise.

**Tabela 2.4**– Amostras de quitosano com diferentes massas moleculares

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de quitosano (m/V)</b>	<b>[HNO<sub>2</sub>] mol/L</b>	<b>Tempo de hidrólise (horas)</b>	<b>Mw (Da)</b>
A	1%	$1 \times 10^{-2}$	1	9540
B	1%	$1 \times 10^{-2}$	0,5	21950
C	1%	$7,5 \times 10^{-3}$	1,5	15730
D	1%	$7,5 \times 10^{-3}$	3	8350
E	1%	$2 \times 10^{-3}$	4	79230
F	0,5%	$5 \times 10^{-3}$	4	130640
G	0,5%	$1,0 \times 10^{-3}$	23	326760

#### **2.3.1.2.2. Ensaio de compatibilidade**

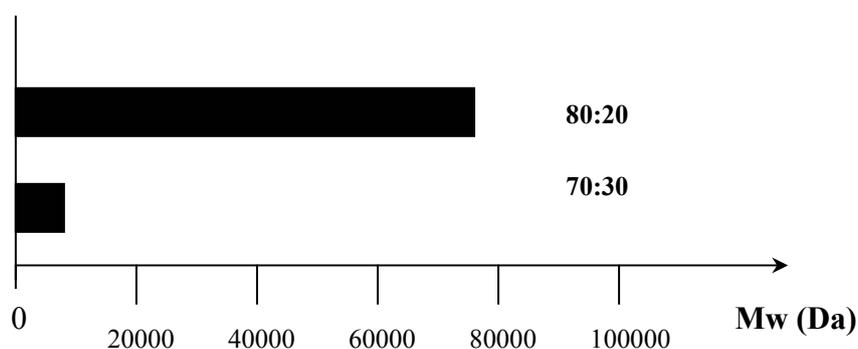
Os resultados obtidos nos ensaios de co-solubilização dos polímeros estão resumidos na tabela 2.5.

**Tabela 2.5**– Resultados obtidos nos ensaios de compatibilidade entre o PET e o quitosano

Amostra	Mw (Da)	70:30	80:20	90:10	100:0
A	9540	✓	✓	...	...
B	21950	✗	✓	...	...
C	15730	✗	✓	...	...
D	8350	✓	✓	...	...
E	79230	✗	✓	...	...
F	130640	✗	✗	✗	✗
G	326760	✗	✗	✗	✗

**Legenda:** ✓ = dissolução ✗= separação de fases

No capítulo 1 foi demonstrado que o solvente que mais satisfaz as características pretendidas para as matrizes é a mistura TFA/DCM 70:30 (V/V). Neste sistema de solvente, apenas foi possível dissolver quitosanos com massas moleculares inferiores a 9540 Da. No entanto, aumentando a concentração de TFA (TFA/DCM 80:20 V/V) já foi possível dissolver amostras de quitosano com maior massa molecular (< 80000Da). Este resultado indica que o intervalo de co-solubilidade entre PET e quitosano é bastante mais amplo para este solvente (figura 2.2). Aumentando ainda mais a concentração de TFA não foi possível aumentar o intervalo de co-solubilidade.



**Figura 2.2** – Co-solubilidade entre o PET e o quitosano em TFA/DCM (70:30 e 80:20 V/V), em função da massa molecular do quitosano.

Trabalhar num intervalo com uma amplitude de massas moleculares muito reduzida pode ser um factor limitante para produção das matrizes. Desta forma, optou-se por utilizar como sistema de solvente a mistura de TFA/DCM 80:20 (V/V). Relativamente às amostras de quitosano, seleccionaram-se as amostras C e D para a produção das matrizes.

### **2.3.2. Ajuste do processo de electrospinning**

No capítulo 1 foi referido que o processo de electrospinning está sempre dependente da constituição do sistema polímero/solvente. Assim, a introdução de um novo polímero no sistema, o quitosano, poderá implicar alguns ajustes nos parâmetros do sistema, relativamente aos parâmetros do sistema de PET simples.

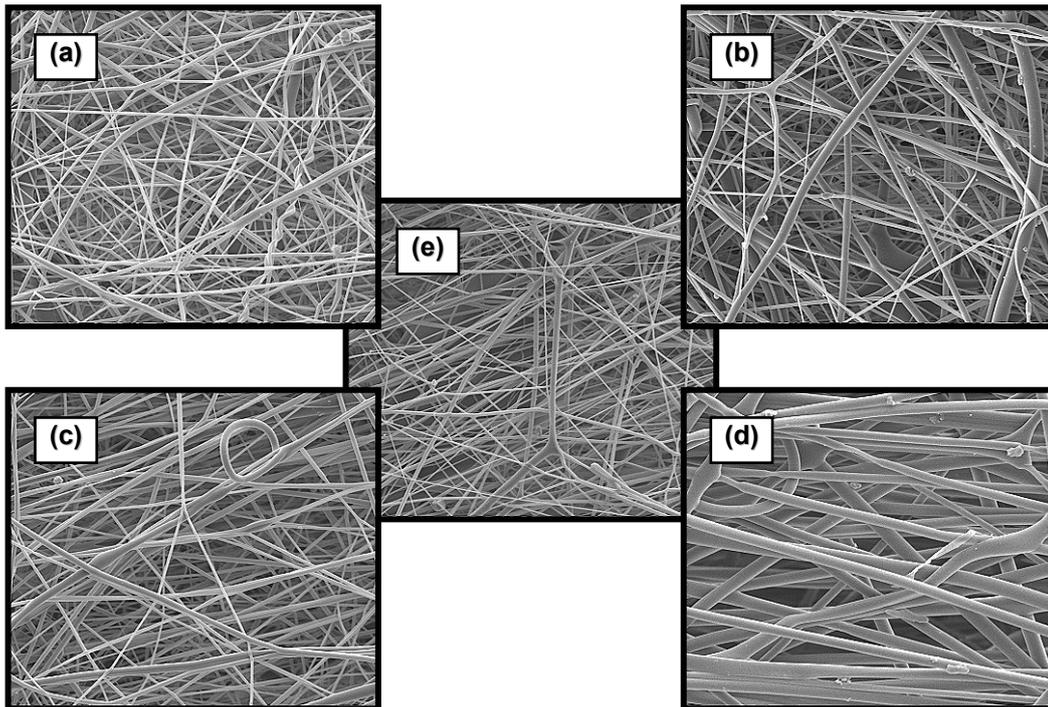
Ao iniciar o processo de electrospinning das soluções de PET com quitosano, verificou-se que o fluxo de solução anteriormente usado (0,2 mL/min) era demasiado elevado, de tal forma que parte da solução escorria da agulha não sendo estirada. Foi feita uma diminuição gradual do fluxo da solução até encontrar o valor para o qual esse efeito não ocorresse. Com base nos resultados observados fixou-se o valor do fluxo da solução em 0,08 mL/min.

Os restantes parâmetros não foram afectados pela adição do quitosano, pelo que foram mantidos.

### **2.3.3. Distribuição dos polímeros na matriz**

De modo a averiguar a forma como o PET e as amostras de quitosano se distribuem pela matriz mista foi feita uma análise por microscopia de varrimento electrónico.

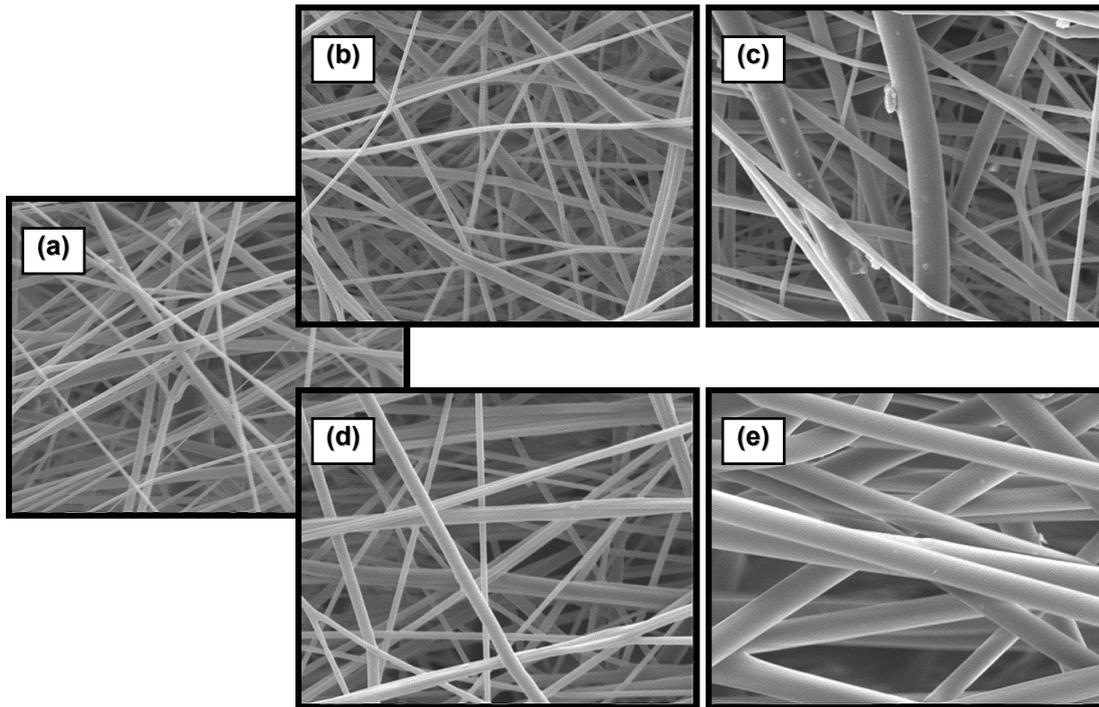
O primeiro facto verificado foi a não ocorrência de aumento significativo do número de aglomerados em relação à matriz de PET. Este resultado demonstra que os dois compostos presentes na solução de electrospinning, PET e quitosano, encontram-se na matriz sob a forma de fibra (figura 2.3).



**Figura 2.3** – Imagem SEM (ampliação 500X) das matrizes (a) PQC2, (b) PQC6, (c) PQD2, (d) PQD6, (e) P.

Apesar de ser possível concluir que ambos se encontram na forma fibrosa, é difícil, a partir da análise microscópica, concluir de que forma os dois polímeros se combinam. No entanto, os ensaios de solubilidade permitiram retirar conclusões importantes acerca desta questão. Este assunto será abordado mais adiante.

A análise SEM permitiu também verificar que a adição de quitosano provocou um grande aumento do diâmetro médio das fibras. Este aumento é tanto maior quanto maior a concentração de quitosano e quanto menor for a sua massa molecular (figura 2.4).



**Figura 2.4** – Imagem SEM (ampliação 1500X) das matrizes (a) P, (b) PQC2, (c) PQC6, (d) PQD2, (e) PQD6.

A distribuição de diâmetros das fibras encontra-se representada na figura 2.5. A sua análise permite verificar um enorme aumento no diâmetro médio das fibras com a adição de quitosano, bem como um alargamento da distribuição de diâmetros.

O aumento do diâmetro das fibras com a adição de quitosano de menor massa molecular (8350 Da) é superior ao aumento provocado pela adição de quitosano 15730 Da, para as concentrações estudadas. Apenas com base na análise morfológica por SEM é não é possível explicar este fenómeno. Novamente os ensaios de solubilidade contribuíram para a explicação deste facto, de modo que este assunto será abordado mais adiante.

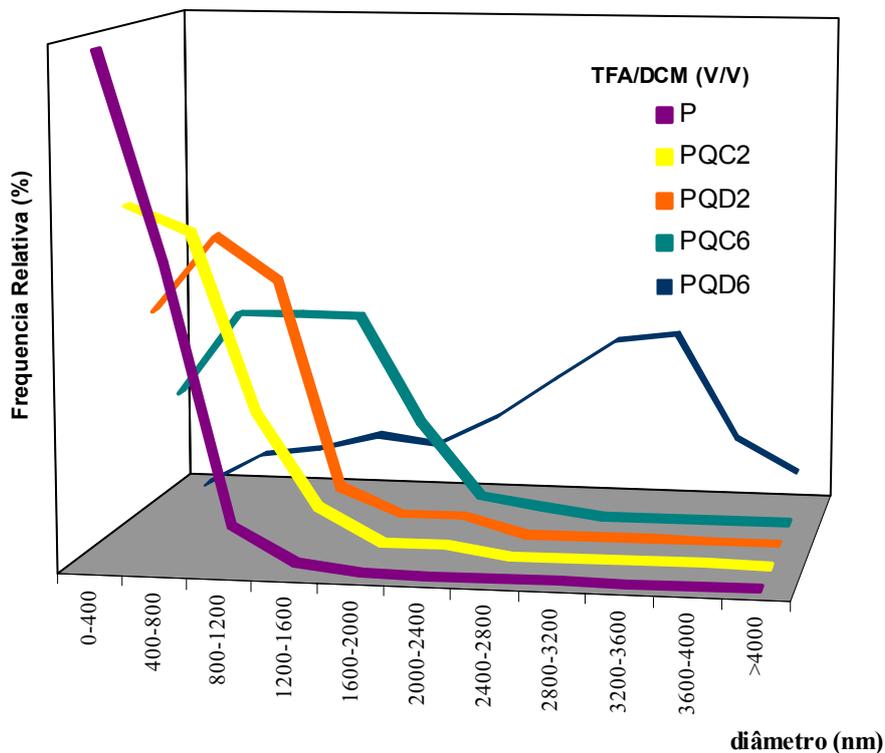


Figura 2.5 – Distribuição de diâmetros das fibras nas matrizes.

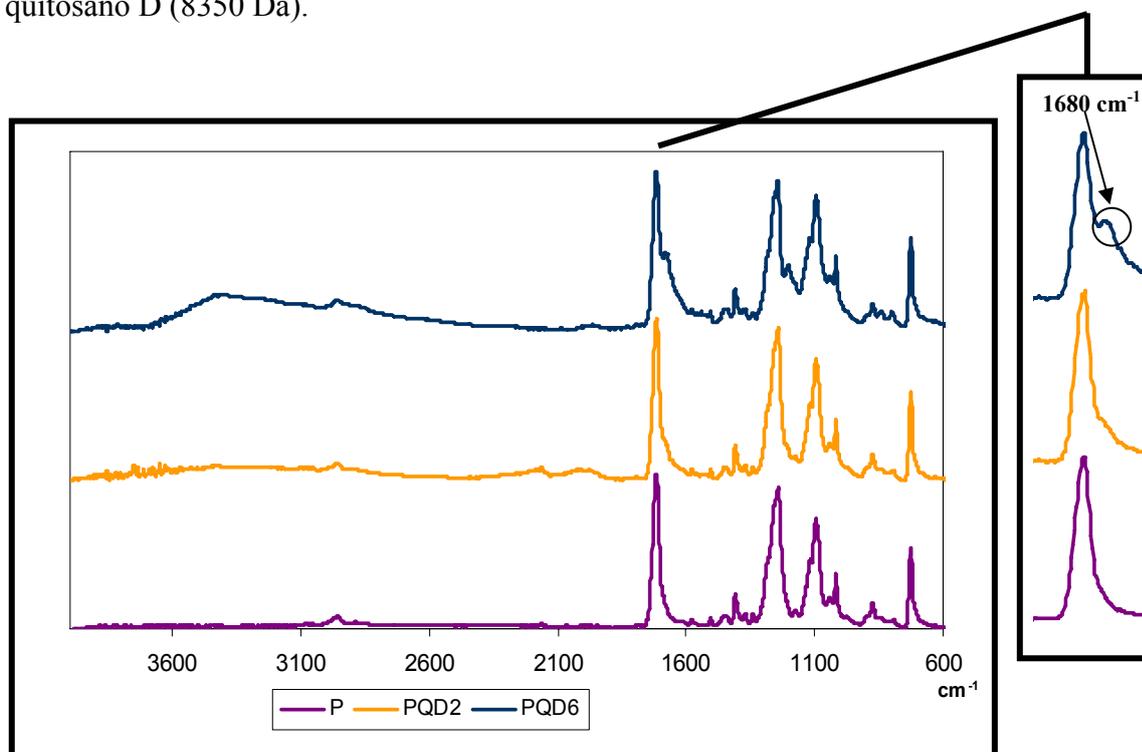
### 2.3.4. Solubilidade das matrizes em água e tampão acetato pH 3,8

Tendo em conta que se pretende a aplicação das matrizes fibrosas desenvolvidas neste estudo no processo de clarificação de sumos, é importante avaliar como as matrizes se comportam em água e meio ácido (característico dos sumos de fruta). Desta forma, submergiram-se as matrizes em água e solução tampão pH 3,8 por um período de tempo prolongado (96 horas), de modo a verificar as alterações máximas que as matrizes possam sofrer. Porém, um processo de filtração não é, normalmente, tão prolongado. Assim matrizes foram filtradas com 150 mL de água destilada e solução tampão pH 3,8 de modo a simular as condições de um processo de filtração.

A presença de quitosano confere à matriz uma tonalidade amarelada, característica do quitosano extraído da casca de caranguejo. Essa tonalidade distingue as matrizes de bicomponentes da matriz de PET, que apresenta uma coloração branca. Uma primeira análise visual dos discos submetidos aos ensaios de solubilidade, permitiu constatar uma

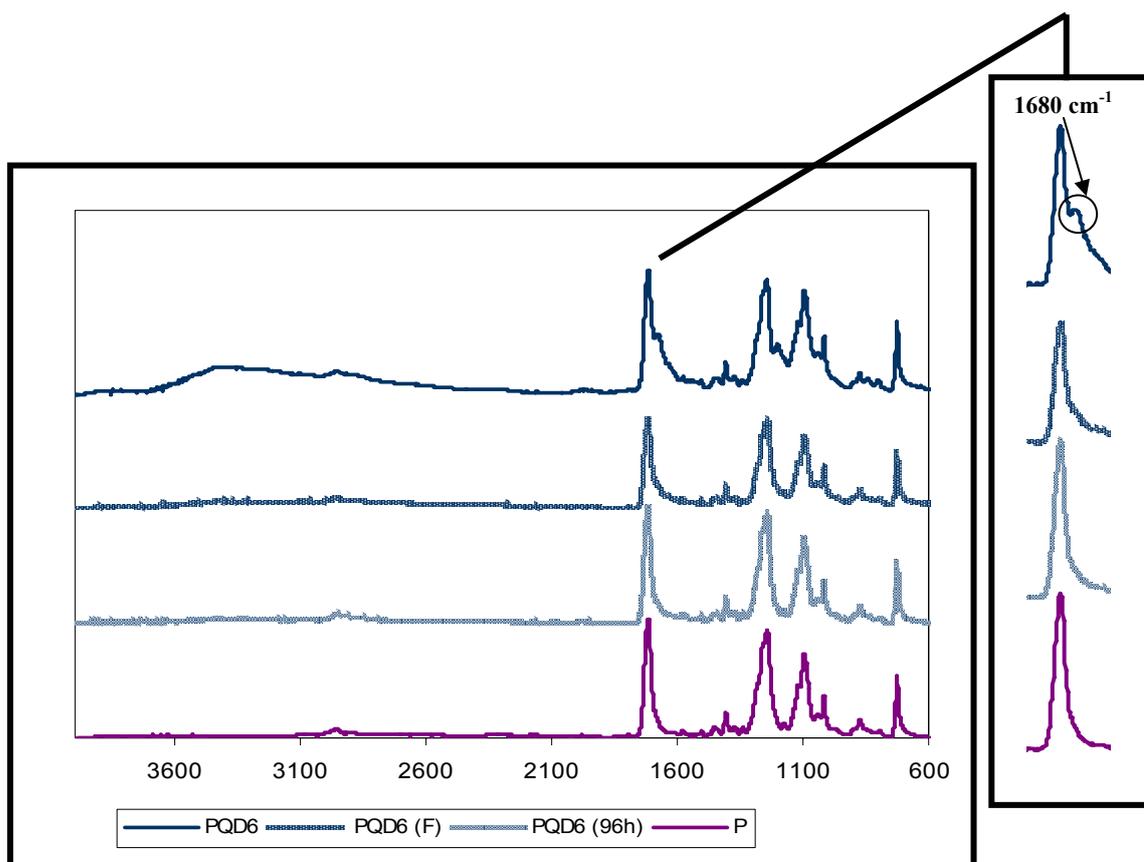
diminuição do tom amarelado nas matrizes com quitosano, o que parecia indicar que parte do quitosano se solubilizou. Para analisar mais aprofundadamente este facto, foi feita uma análise da absorção das matrizes na zona do infravermelho.

Os espectros de Infravermelho das membranas que possuem quitosano na sua constituição, apresentavam algumas diferenças relativamente ao espectro da membrana de PET, sendo a mais notável o aparecimento de um pico no comprimento de onda  $1680\text{ cm}^{-1}$ . Este pico está, provavelmente, associado ao estiramento da ligação  $\text{C}=\text{O}$  do grupo carbonilo (amida I), geralmente descrito a ocorrer em quitosanos nativos entre  $1655\text{ cm}^{-1}$  e  $1630\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$  (amida I). É de notar que existe um desvio, relativamente ao comprimento de onda dessas bandas, o que pode ser devido a uma mudança de conformação das moléculas de quitosano, durante a sua associação com outro polímero e sua disposição na forma de fibra (a vibração das ligações pode ser alterada). Neste estudo, pretende-se apenas utilizar as informações de absorção das matrizes na zona do infravermelho como referência da presença de quitosano. O pico  $1680\text{ cm}^{-1}$  é, portanto, indicativo da presença de quitosano. Verificou-se, como seria de esperar, que a intensidade deste pico aumenta com o aumento da concentração de quitosano na matriz, para as duas amostras estudadas. Na figura 2.6 está representada, como exemplo, a variação dos espectros das matrizes com a adição de quitosano D (8350 Da).



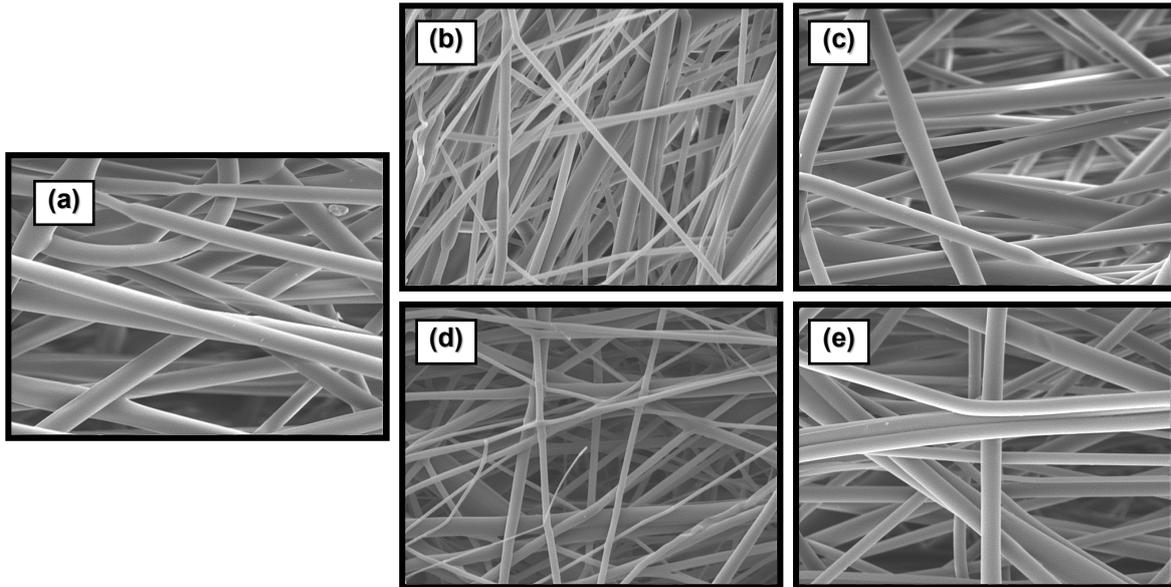
**Figura 2.6** – Espectro de absorção no infravermelho das matrizes P, PQD2 e PQD6.

Verificou-se que o pico indicativo da presença de quitosano diminui bastante nas matrizes que foram submetidas a filtração com água e solução tampão, o que indica que parte do quitosano se solubilizou durante o processo de filtração passando da matriz para o filtrado. Nas matrizes submersas em água e solução tampão durante 96 horas a este efeito é ainda mais significativo, podendo-se mesmo afirmar que os espectros obtidos eram praticamente iguais ao da matriz de PET, com o desaparecimento quase total do pico referência do quitosano ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ). Este efeito ocorre para as duas amostras de quitosano utilizadas o que mostra que, em ambos os casos, o quitosano presente na matriz é removido em meio aquoso, tanto a pH ácido como a pH perto da neutralidade. No entanto, a diminuição da intensidade do pico  $1680\text{ cm}^{-1}$  após o ensaio de solubilização é mais evidente para a amostra de quitosano D. Na figura 2.7 estão representados como exemplo os espectros obtidos durante o ensaio de solubilidade da matriz PQD6 em água.



**Figura 2.7** – Espectro de absorção no infravermelho das matrizes P, PQD6, PQD6 ( $\text{H}_2\text{O-F}$ ) e PQD6 ( $\text{H}_2\text{O-96h}$ ).

Após verificar que grande parte do quitosano foi removido das matrizes por dissolução em água e solução tampão surge a necessidade de avaliar microscopicamente de que forma a característica fibrosa das matrizes foi afectada (figura2.8). Esta análise poderá, inclusivamente, fornecer informações importantes acerca do modo como os dois polímeros se distribuem pela matriz.



**Figura 2.8** – Imagem SEM (ampliação 1500X) das matrizes: (a) PQD6, (b) PQD6 (H<sub>2</sub>O-96h) (c) PQD6 (H<sub>2</sub>O-F), (d) PQD6 (3,8-96h) e PQD6 (3,8-F).

A análise por SEM, das matrizes composta pelas duas amostras de quitosano estudadas, revelou que:

- ✓ A densidade de fibras na matriz não é alterada após as lavagens;
- ✓ As fibras não apresentam deformações (porosidades, rupturas ou estreitamentos locais) comparativamente às respectivas matrizes originais;
- ✓ O diâmetro médio das fibras diminui de forma bastante evidente após lavagem em água ou solução tampão pH 3,8;
- ✓ A diminuição do diâmetro é tanto maior quanto maior a concentração de quitosano.

Na tentativa de compreender o modo como as moléculas dos dois compostos se arranjam durante a formação da fibra, foram lançadas três hipóteses distintas:

- I. No processo de electrospinning, durante a aplicação da diferença de potencial, as moléculas de quitosano e de PET separam-se levando à formação de fibras distintas. Neste caso a matriz apresenta na sua constituição dois tipos distintos de fibras, fibras de PET e fibras de quitosano.
- II. As moléculas de quitosano e PET encontram-se misturadas de forma homogénea durante aplicação da diferença de potencial, dando origem a fibras mistas homogéneas. Neste caso a matriz é constituída por fibras bicomponentes homogéneas.
- III. Durante a aplicação da diferença de potencial existe uma distribuição preferencial das moléculas dos dois compostos, formando uma fibra mista, porém com zonas distintas, por exemplo com quitosano na camada externa e o PET numa camada mais interna, ou vice-versa.

Sabendo que grande parte do quitosano se solubilizou, é possível, a partir de uma análise microscópica das matrizes antes e depois dos teste de solubilização, avaliar qual das três hipóteses referidas está correcta.

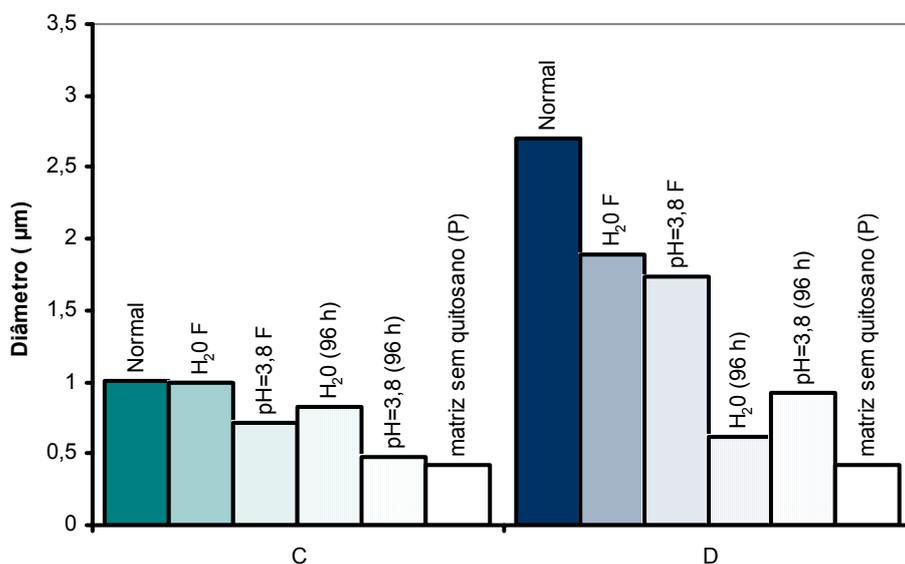
Na primeira hipótese (I) seria de prever que as fibras de PET permanecessem intactas, uma vez que são insolúveis nestas condições, e as fibras de quitosano se dissolveriam. Assim, seria de esperar que a matriz apresentasse “espaços vazios” nos locais correspondentes às fibras de quitosano existentes anteriormente.

Se a segunda hipótese (II) estivesse correcta, a solubilização do quitosano iria provocar uma deformação nas fibras resultantes, ou provável aumento da rugosidade ou porosidade das fibras, uma vez que o espaço ocupado anteriormente pelas moléculas de quitosano ficariam livres.

Por fim, na terceira hipótese (III), apenas podemos considerar que o quitosano se encontra na camada externa, revestindo a fibra de PET, pois se encontrasse na camada interna não se solubilizaria. Neste caso seria de se esperar uma diminuição do diâmetro das fibras, uma vez que o revestimento de quitosano se solubilizou.

Os factos verificados na análise por SEM vão de encontro ao resultado esperado pela terceira hipótese colocada, ou seja, o quitosano que se distribuiu pela camada externa da fibra foi removido durante as lavagens e a camada interna constituída por PET, permanece intacta.

Na figura 2.9 está graficamente representada a variação dos diâmetros médios das diferentes matrizes durante os ensaios de solubilidade.



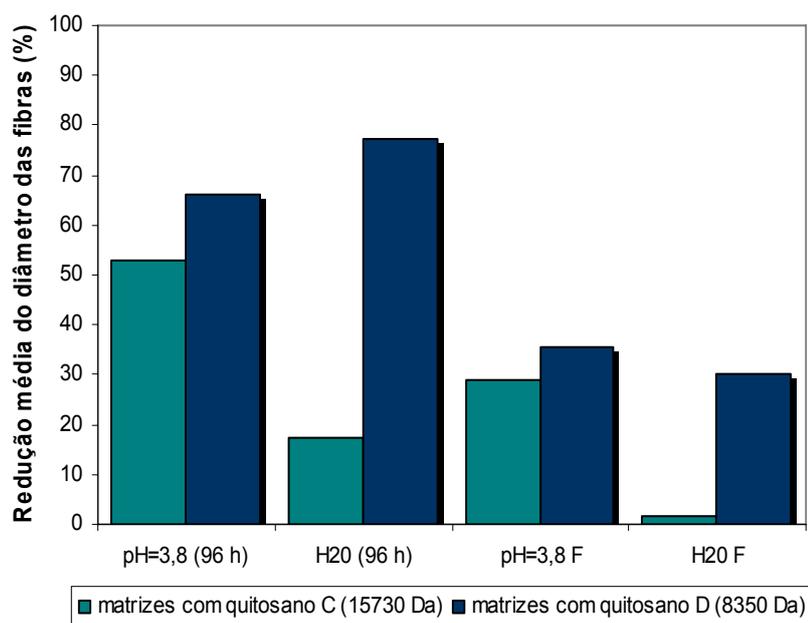
**Figura 2.9** – Representação gráfica dos diâmetros médios das fibras das matrizes com quitosano C e D, antes e após os ensaios de solubilidade.

Relativamente às diferenças encontradas entre as matrizes compostas por quitosano com diferente massa molecular verificou-se que a diminuição do diâmetro com as lavagens, tanto em água como em solução tampão, é bastante mais significativa na amostra com menor massa molecular. Este resultado era previsto, uma vez que a solubilidade do quitosano, tanto em água como em condições ácidas, aumenta com a diminuição da sua massa molecular.

A partir do diâmetro médio das fibras nas matrizes originais (antes da lavagem) é possível calcular a percentagem de redução dos diâmetros (figura 2.10). Como foi referido anteriormente esta redução é maior, em todos os casos estudados, nas matrizes com

quitosano de menor massa molecular. Para esta amostra de quitosano a dissolução máxima ocorre em água (redução de diâmetro ~80%). Pelo contrário, o quitosano de massa molecular superior é mais solúvel, tal como esperado, em condições ácidas.

Quanto aos diferentes ensaios de solubilização estudados (imersão e filtração), verificou-se que ocorre maior dissolução de quitosano no processo de imersão, visto que o tempo de contacto entre o quitosano e os solventes é muito superior.



**Figura 2.10** – Representação gráfica da redução (%) dos diâmetros médios das fibras das matrizes após os ensaios de solubilidade.

A partir dos diâmetros médios das fibras nas matrizes, antes e após cada ensaio de solubilidade, e do diâmetro médio das fibras na matriz sem quitosano (P), é possível estimar a percentagem final de quitosano na matriz (tabela 2.6).

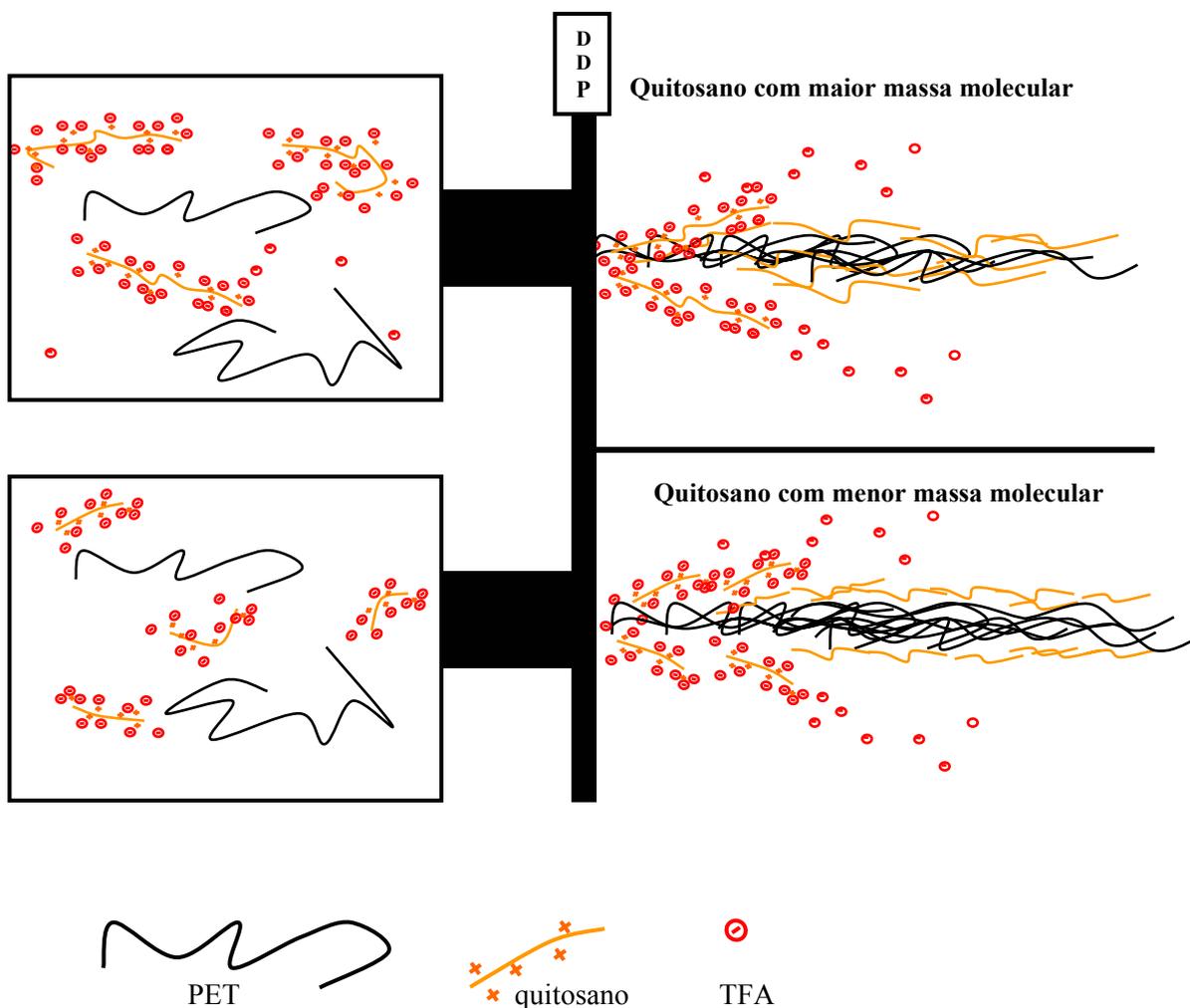
**Tabela 2.6** – Solubilização do quitosano em água e solução tampão pH 3,8.

Amostra	PQC6			PQD6		
	Diâmetro médio (µm)	Redução do diâmetro após lavagem (%)	Proporção de quitosano na matriz (%)	Diâmetro médio (µm)	Redução do diâmetro após lavagem (%)	Proporção de quitosano na matriz (%)
<b>P</b>	0,416	...	0	0,416	...	0
<b>Sem lavagem</b>	1,007	0	17	2,709	0	17
<b>pH=3,8 (96 h)</b>	0,475	53	2	0,917	66	4
<b>H<sub>2</sub>O (96 h)</b>	0,831	17	12	0,617	77	1
<b>pH=3,8 F</b>	0,717	29	9	1,743	36	10
<b>H<sub>2</sub>O F</b>	0,989	2	16	1,887	30	11

Com base nas informações recolhidas durante a análise das matrizes por SEM e FTIR, antes e depois dos ensaios de solubilidade, formulou-se a seguinte hipótese:

Na solução polimérica (PET + quitosano) as moléculas de TFA encontram-se, preferencialmente, ao redor das moléculas de quitosano, estabelecendo-se uma ligação iónica entre o grupo amina do quitosano (protonado em meio ácido  $\text{NH}_3^+$ ) e o TFA, que se encontra negativamente carregado. Durante a aplicação da diferença de potencial, as moléculas solvente começam a evaporar, “arrastando” as moléculas de quitosano para a superfície (interface) do jacto. Desta forma ocorre uma separação entre as moléculas de PET, que permanecem no interior da fibra, e as moléculas de quitosano, que migram para a superfície. No caso das moléculas de quitosano de menor massa molecular, por apresentarem maior mobilidade, essa migração é facilitada, o que pode explicar o maior aumento de diâmetro verificado neste caso (quitosano D). É necessário ter em conta que o tempo que as moléculas possuem para esta migração é bastante reduzido. Desta forma, a migração das moléculas de maior massa molecular não é tão pronunciada e assim, parte destas moléculas permanece numa zona mais interior da fibra. Os ensaios de solubilidade também vão ao encontro desta teoria: na fibra mista, as moléculas de quitosano de inferior massa molecular encontram-se na superfície da fibra e estão separadas, praticamente na sua totalidade, das moléculas de PET. Em contacto com os solventes analisados estas moléculas libertam-se da fibra por dissolução, provocando uma diminuição do diâmetro (as fibras resultantes serão muito semelhantes às fibras de PET puro). No caso do quitosano de

maior massa molecular, as moléculas de quitosano da superfície dissolvem-se em contacto com o solvente, mas as moléculas mais internas não conseguem desprender-se da fibra, o que explica a menor redução de diâmetro verificada.

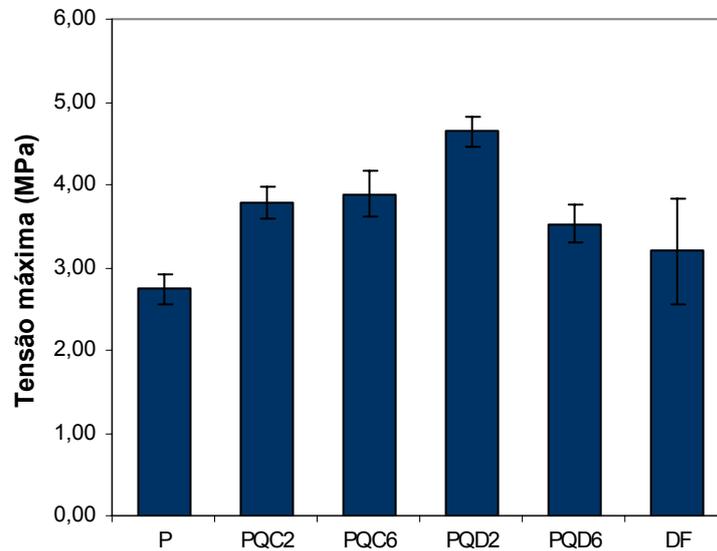


**Figura 2.11** – Representação esquemática do processo de electrospinning de soluções mistas (PET + quitosano).

### 2.3.5. Propriedades mecânicas das matrizes

Uma vez que a resistência mecânica é um atributo essencial para uma membrana de filtração, aplicação que se pretende avaliar neste trabalho, foi realizado um estudo

preliminar para avaliar as propriedades mecânicas das matrizes fibrosas e o modo como a presença de quitosano afecta estas características. Na figura 2.12 estão representados graficamente os resultados obtidos para a tensão máxima de ruptura das membranas.

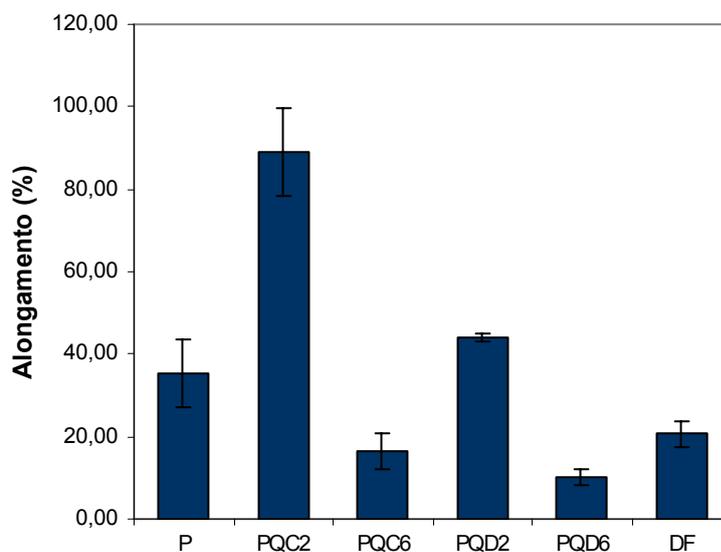


**Figura 2.12** – Tensão máxima de ruptura das matrizes fibrosas

De um modo geral, a presença de quitosano altera as propriedades mecânicas da matriz, sendo este efeito complexo e dependente, quer da concentração quer da massa molecular do quitosano.

O quitosano de maior massa molecular promove um aumento da tensão máxima de ruptura da matriz, para as duas concentrações estudadas. No caso da amostra de quitosano de menor massa molecular, foi verificado um maior efeito na força máxima de ruptura para a matriz com menor concentração de quitosano.

O quitosano provocou alterações no alongamento máximo das matrizes, sendo que este efeito varia com a concentração e massa molecular do quitosano. Os resultados obtidos nos ensaios de alongamento das matrizes estão representados na figura 2.13.



**Figura 2.13** – Alongamento máximo das matrizes fibrosas

Verificou-se que, quando presente em menor concentração, o quitosano promove um aumento do alongamento máximo da matriz. Este efeito pode ser devido ao posicionamento das moléculas de quitosano nos espaços existentes entre as moléculas de PET, causando uma maior flexibilidade ao material. No entanto, se a sua concentração for exageradamente elevada, a matriz torna-se mais rígida e quebradiça. Uma possível explicação para este facto pode estar relacionada com a incompatibilidade entre os dois polímeros: para concentrações superiores de quitosano, a sua compatibilidade com o PET diminui, e as moléculas de cada um destes compostos ficam com maior tendência para associarem-se entre si. Assim, o quitosano tenderá a se separar do PET e desta forma não ocupa os espaços entre estas moléculas. As moléculas de PET, ao associarem-se fortemente entre si, originam uma matriz fibrosa mais quebradiça e com menor extensibilidade.



## **Capítulo 3**

**Aplicação das matrizes na clarificação do sumo de  
maçã – ensaios preliminares.**

### **3.1. Introdução**

Nos capítulos anteriores foram desenvolvidas e caracterizadas diferentes matrizes produzidas por electrospinning. Neste capítulo serão descritos e analisados os ensaios realizados para testar o potencial destas matrizes como membranas para a clarificação do sumo de maçã.

#### **3.1.1. Clarificação de sumo de maçã**

O sumo de maçã apresenta uma composição coloidal complexa com quantidades relativamente elevadas (4,4 g/L) de alguns tipos de polímeros, como polissacarídeos e proteínas. Este tipo de compostos afectam o processamento, a estabilidade e a aceitação, por parte do consumidor, do sumo de maçã. O sumo de maçã apresenta ainda uma série de compostos fenólicos que podem afectar a sua turbidez, cor e estabilidade, ao sofrerem reacções de polimerização e/ou oxidação. Assim, a indústria alimentar inclui um passo no processamento do sumo que visa a remoção deste tipo de compostos: a clarificação. A clarificação do sumo de maçã tem sido bastante estudada, com vista ao desenvolvimento de um processo simples, rápido, económico e limpo, que permita a obtenção de um sumo estável e com propriedades organolépticas adequadas (Youn *et al.* 2004; Li *et al.* 2006).

#### **3.1.2. Agentes de clarificação**

A clarificação do sumo de maçã é normalmente realizada pela adição de agentes clarificantes ou por ultrafiltração.

Os agentes clarificantes mais utilizados na clarificação do sumo de maçã são a bentonite, a gelatina, a sílica e alguns taninos (Rungsardthong *et al.* 2006). O efeito clarificante destes compostos resulta, principalmente, da precipitação de proteínas e compostos fenólicos (Gokmen & Cetinkaya 2007). De seguida é feita uma filtração para remoção do precipitado formado. Este processo de clarificação é normalmente demorado e dispendioso, podendo ainda causar alterações nas características sensoriais do sumo (Bornet & Teissedre 2005).

O quitosano, devido à sua natureza policatiónica consegue ligar-se a proteínas e compostos fenólicos formando complexos insolúveis. Demonstrou-se que a sua eficácia é semelhante à dos agentes clarificantes convencionais, apresentando como vantagens adicionais o facto de possuir actividade antibacteriana e antifúngica e de não provocar alterações organolépticas no sumo (Chatterjee *et al.* 2004; Kisko *et al.* 2005; Rungsardthong *et al.* 2006).

### **3.1.3. Ultrafiltração**

A ultrafiltração tem-se tornado cada vez mais uma alternativa aos processos convencionais de clarificação. Este processo, para além de mais eficaz e controlado, uma vez que permite uma retenção de compostos mais selectiva, é também mais barato, rápido e limpo (Youn *et al.* 2004). No entanto, uma grande desvantagem deste processo é a diminuição do fluxo com o tempo de filtração por saturação dos poros da membrana. Os principais compostos responsáveis por essa redução de fluxo são as pectinas, proteínas, compostos fenólicos e fibras presentes nas fracções solúveis e suspensas (Gokmen & Cetinkaya 2007). Assim, muitos estudos têm sido desenvolvidos com vista a obter maior eficácia no processo de filtração (de Bruijn *et al.* 2002; de Bruijn *et al.* 2003).

### **3.1.4. Electrospinning e membranas de filtração**

As matrizes produzidas por electrospinning possuem uma série de características que as torna atractivas para a tecnologia de separação, tais como a elevada porosidade, o reduzido tamanho dos poros, a sua disposição interconectada e a elevada razão superfície/volume. Desta forma já foram desenvolvidos e comercializados filtros de ar produzidos por electrospinning (Gopal *et al.* 2006).

A aplicação de membranas produzidas por electrospinning na clarificação de sumos pode combinar o efeito de filtração, devido à sua porosidade, com uma interacção química (por acção dos constituintes da membrana), o que pode ser uma vantagem para este processo. Não foram encontrados relatos da utilização deste tipo de membranas na filtração ou clarificação de sumos. O desenvolvimento de um estudo do potencial de aplicação destas membranas na clarificação de sumos constitui um desafio interessante.

## **3.2. Materiais e métodos**

### **3.2.1. Amostras**

- Neste estudo foram utilizadas maçãs Golden Delicious adquiridas no comércio local.

### **3.2.2. Preparação do sumo de maçã**

Descascaram-se as maçãs e cortaram-se em pequenos pedaços. O sumo de maçã foi obtido por prensagem e separação da polpa, através de uma centrifugadora (Molinox EasyClean). O sumo foi tratado enzimaticamente com 0,75 mL/L Pectinex Ultra SPL (Sigma, pectinase de *Aspergillus aculeatus*) e 0,15 g/L  $\alpha$ -amilase (de *Bacillus subtilis*, Fluka, 49 U/mg), durante 2 horas a 50°C, sob agitação, de modo a hidrolisar amido e pectinas. A ausência de amido foi confirmada pelo teste de reacção ao iodo e a ausência de pectinas pelo teste da precipitação com etanol.

#### ***Teste do iodo***

Adicionaram-se volumes iguais de sumo e solução de iodo (0,1 g iodo + 2 g iodeto de potássio em 100 mL de água destilada), observando-se a cor formada. A cor azul indica a presença de amido e a cor laranja ausência de amido (McLellan & Padilla-Zakour 2005).

#### ***Teste do etanol***

Misturaram-se volumes iguais de sumo e solução aquosa de etanol (95 g/100 mL); a formação de um precipitado indica a presença de pectina (Girard & Fukumoto 1999).

Após o tratamento enzimático, a temperatura do sumo foi aumentada até 90°C, durante 5 minutos, de modo a promover a desnaturação das enzimas. O sumo foi arrefecido até a temperatura de 20°C e filtrado com um “filtro de pano” (para retirar parte da matéria

insolúvel), obtendo-se assim a amostra de sumo não clarificado (NC). A partir da amostra de sumo não clarificado foram efectuados diferentes tratamentos de clarificação que serão descritos de seguida.

### **3.2.3. Clarificação do sumo de maçã**

#### **3.2.3.1. Processo convencional**

O processo convencional de clarificação do sumo de maçã foi realizado de acordo com um método previamente proposto (Gokmen *et al.* 2001). Deste modo, adicionou-se a 150 mL do sumo obtido anteriormente (NC) 500 mg/L de gelatina e 2500 mg/L de bentonite e manteve-se a mistura a 50°C, sob agitação, durante 2 horas. A mistura foi então arrefecida (10°C) e centrifugada durante 10 minutos a 4000 RPM.

#### **3.2.3.2. Processo de clarificação com membranas produzidas por electrospinning**

##### **3.2.3.2.1. Produção da matriz dupla camada (DC)**

A produção da matriz com dupla camada foi efectuada seguindo o processo descrito em § 2.2.5. No entanto, utilizaram-se inicialmente 10 mL de solução de poliéster seguidos de 10 mL de solução PQD6, sem retirar a matriz do colector. A morfologia da matriz foi analisada seguindo o procedimento descrito em § 2.2.6.

##### **3.2.3.2.2. Filtração com as membranas produzidas por electrospinning**

Para filtração e clarificação do sumo de maçã testaram-se as matrizes fibrosas produzidas por electrospinning, preparadas como anteriormente descrito (§ 2.2.5), e a matriz de dupla camada. As matrizes foram recortadas em círculos com 63,4 mm de diâmetro para serem utilizadas como membrana de filtração. Os ensaios de filtração foram realizados através de um sistema de filtração MILLIPORE “Stirred Ultrafiltration Cells” (8200). Recorrendo a este sistema, filtraram-se através das membranas 150 mL de sumo, sob pressão directa de azoto (0,05 bar), com agitação constante.

### **3.2.3.3. Ultrafiltração**

O ensaio de ultrafiltração foi realizado com uma membrana de ultrafiltração de celulose regenerada “Millipore” (*cut off* 100 KDa). O procedimento encontra-se descrito em (3.2.3.2.2), porém a pressão de azoto utilizada foi de 3,5 bar.

### **3.2.3.4. Tratamento com quitosano (pó)**

Adicionou-se 0,2% m/V de quitosano não hidrolisado (§ 2.2.1) a 150 mL de sumo não clarificado (NC). Deixou-se actuar durante 2 horas, à temperatura ambiente (~25°C), com agitação constante. Filtrou-se a suspensão anterior com a membrana P, seguindo o procedimento descrito em 3.2.3.2.2.

## **3.2.4. Métodos de análise do sumo de maçã**

### **3.2.4.1. Determinação da turbidez e cor**

A turbidez e a cor foram avaliadas com base na transmitância (%) a 650 nm e absorvância a 440 nm, respectivamente (Gokmen *et al.* 2001).

### **3.2.4.2. Sólidos totais**

A percentagem de sólidos totais no sumo foi determinada pelo método do resíduo seco (diferença de massa entre o sumo antes e após secagem em estufa durante 12 horas a 110°C).

### **3.2.4.3. Sólidos solúveis**

Os sólidos solúveis foram determinados a partir de um refractómetro manual Atago (Tóquio, Japão). Os resultados foram expressos em ° Brix.

#### **3.2.4.4. pH e acidez titulável**

O pH das amostras foi medido directamente através de um medidor de pH (inoLab - terminal Level 3).

A acidez titulável foi determinada com base na norma portuguesa (NP EN 12147, 1999). Resumidamente, titularam-se 25 mL de sumo com uma solução de hidróxido de sódio 0,25 mol/L, registando-se o volume gasto até se atingir um pH= 8,1. A acidez titulável foi expressa em g ácido málico/ 100 mL de sumo.

#### **3.2.4.5. Determinação do teor de fenólicos totais**

O teor de fenólicos totais nas amostras de sumo foi determinado através método de Folin – Ciocalteu. O procedimento experimental é descrito de seguida:

***Preparação da solução de ácido gálico (5 g/L):*** Num balão volumétrico de 100 mL dissolveram-se 0,500 g de ácido gálico, em 10 mL de etanol, e aferiu-se com água.

***Preparação dos padrões e leitura das absorvâncias:*** Para efectuar a recta de calibração, adicionaram-se 0, 1, 2, 3, 5 e 10 mL da solução padrão de ácido gálico, preparada anteriormente, a balões volumétricos de 100 mL e aferiu-se com água. Pipetaram-se 40 µL de cada padrão e 3,16 mL de água, para tubos de ensaio devidamente identificados. De seguida, adicionaram-se a cada tubo 200 µL de reagente de Folin – Ciocalteu e agitou-se bem. Esperou-se, aproximadamente, 1 minuto. Adicionaram-se 600 µL de solução de carbonato de sódio 20% (m/V) e agitou-se novamente. Após 2 horas procedeu-se à leitura da absorvância de cada solução a 765 nm.

***Análise das amostras:*** Pipetaram-se 9 mL de sumo para um balão volumétrico de 10 mL aferiu-se com etanol. Para um tubo de ensaio pipetaram-se 40 µL da solução anterior e 3,16 mL de água. De seguida, adicionaram-se 200 µL de reagente de Folin – Ciocalteu e agitou-se bem. Esperou-se 1 minuto. Adicionaram-se 600 µL de

solução de carbonato de sódio 20% (m/V) e agitou-se novamente. Após 2 horas procedeu-se à leitura da absorvância de cada solução a 765 nm.

#### **3.2.4.6. Teor de proteínas**

O teor de proteína foi determinado recorrendo a um *kit* de determinação de proteína, com precipitação prévia das proteínas, de modo a eliminar possíveis interferentes (Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification- Sigma).

#### **3.2.4.7. Análise de açúcares por HPLC**

A análise de açúcares (glucose, frutose e sacarose) foi efectuada num sistema de HPLC (Beckman System Gold), com detector de índice de refração. A eluição foi realizada utilizando como fase móvel acetonitrilo/água (75/25) com fluxo 1.5 mL/min, através de uma coluna (YMC-Pack polyamine II S-5um; 250\*4.6mm). A determinação quantitativa foi feita com base nas curvas de calibração dos respectivos padrões.

#### **3.2.4.8. Análise de ácidos orgânicos por HPLC**

A análise dos ácidos orgânicos foi efectuada num sistema de HPLC (Beckman System Gold), com detector de matriz de díodos (detecção a 210nm). A eluição foi realizada utilizando como fase móvel ácido sulfúrico 5 mmol/L, com fluxo de 0.6 mL/min, através de uma coluna (Aminex Ion Exclusion HPX-87H 300\*47.8 mm). Foram estudados 4 ácidos orgânicos (ácido málico, ácido succínico, ácido oxálico e ácido láctico). A determinação quantitativa foi feita com base nas curvas de calibração dos respectivos padrões.

#### **3.2.4.9. Análise estatística**

A preparação e clarificação do sumo de maçã foram realizadas em triplicado; as análises realizadas a cada amostra de sumo foram igualmente realizadas em triplicado. As diferenças entre os tratamentos, para cada um dos parâmetros estudados, foram avaliadas

por análise de variância (ANOVA). Quando a ANOVA revelou diferença significativa, foi feita uma comparação de cada um dos tratamentos com o tratamento NC (controlo), através do teste t-Student de modo a encontrar alterações significativas provocadas pelo processo de clarificação ( $p < 0,05$ ).

### **3.3. Resultados e discussão**

Nesta secção analisam-se os tratamentos realizados e apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos na clarificação do sumo de maçã, comparando-os com tratamentos mais convencionais actualmente em uso a nível industrial.

A tabela 3.1. apresenta os tratamentos realizados.

**Tabela 3.1** – Identificação dos tratamentos estudados.

<b>Abreviatura</b>	<b>Identificação do tratamento</b>
NC	Não clarificado
TC	Tratamento convencional
P	Filtração com membrana P
PQC2	Filtração com membrana PQC2
PQC6	Filtração com membrana PQC6
PQD2	Filtração com membrana PQD2
PQD6	Filtração com membrana PQD6
DC	Filtração com membrana dupla camada
Q	Tratamento com quitosano (pó)
UF	Ultrafiltração

#### **3.3.1. Escolha dos tratamentos**

Para uma melhor compreensão da estratégia adoptada no estudo da clarificação do sumo de maçã é apresentada, de seguida, uma breve justificativa da escolha de cada um dos tratamentos estudados.

### **3.3.1.1. Tratamento com a membrana de PET**

O objectivo deste trabalho, como já foi referido, consiste no desenvolvimento de membranas para a clarificação de sumos. Devido às suas características morfológicas, conforme foi demonstrado anteriormente, as membranas produzidas por electrospinning apresentam um elevado potencial de aplicação nesse processo. No caso da matriz de PET (P), sem inclusão de quitosano, assume-se que o modo de actuação na clarificação baseia-se exclusivamente em interacções físicas, isto é, nesta membrana a clarificação será resultado da retenção de partículas/compostos que não conseguem atravessar os poros da matriz.

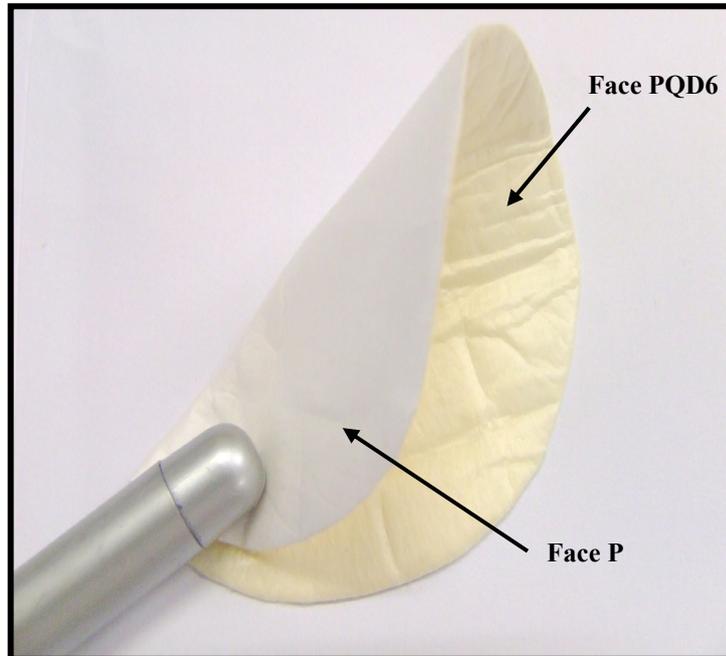
### **3.3.1.2. Tratamentos com as membranas mistas (PET + quitosano)**

Ao adicionar o quitosano à matriz, um composto cuja capacidade clarificante já foi demonstrada, a clarificação poderá resultar não apenas de um processo físico, mas também químico, uma vez que o quitosano pode estabelecer ligações com alguns compostos responsáveis pela turvação do sumo. Deste modo, pretendeu-se testar a influência do quitosano no processo de clarificação por filtração com as matrizes obtidas por electrospinning. Para isso, utilizaram-se duas amostras de quitosano com massas moleculares distintas (8350 Da e 15730 Da). No capítulo 2 deste trabalho, demonstrou-se já que estas duas amostras de quitosano dão origem a uma organização molecular diferente, quando presentes nas fibras juntamente com o PET. Julga-se, por isso, que a sua disponibilidade para estabelecer ligações com os compostos pretendidos possa ser diferente.

### **3.3.1.3. Tratamento com a membrana dupla camada (DC)**

Uma vez que o quitosano de menor massa molecular é bastante solúvel ao pH do sumo de maçã, como foi demonstrado no capítulo anterior, este composto poderia solubilizar-se e assim, apesar de interagir com os compostos pretendidos, permanecer em solução e consequentemente não promoveria a clarificação do sumo. Desta forma foi desenvolvida uma membrana dupla camada, com o objectivo de reter o quitosano

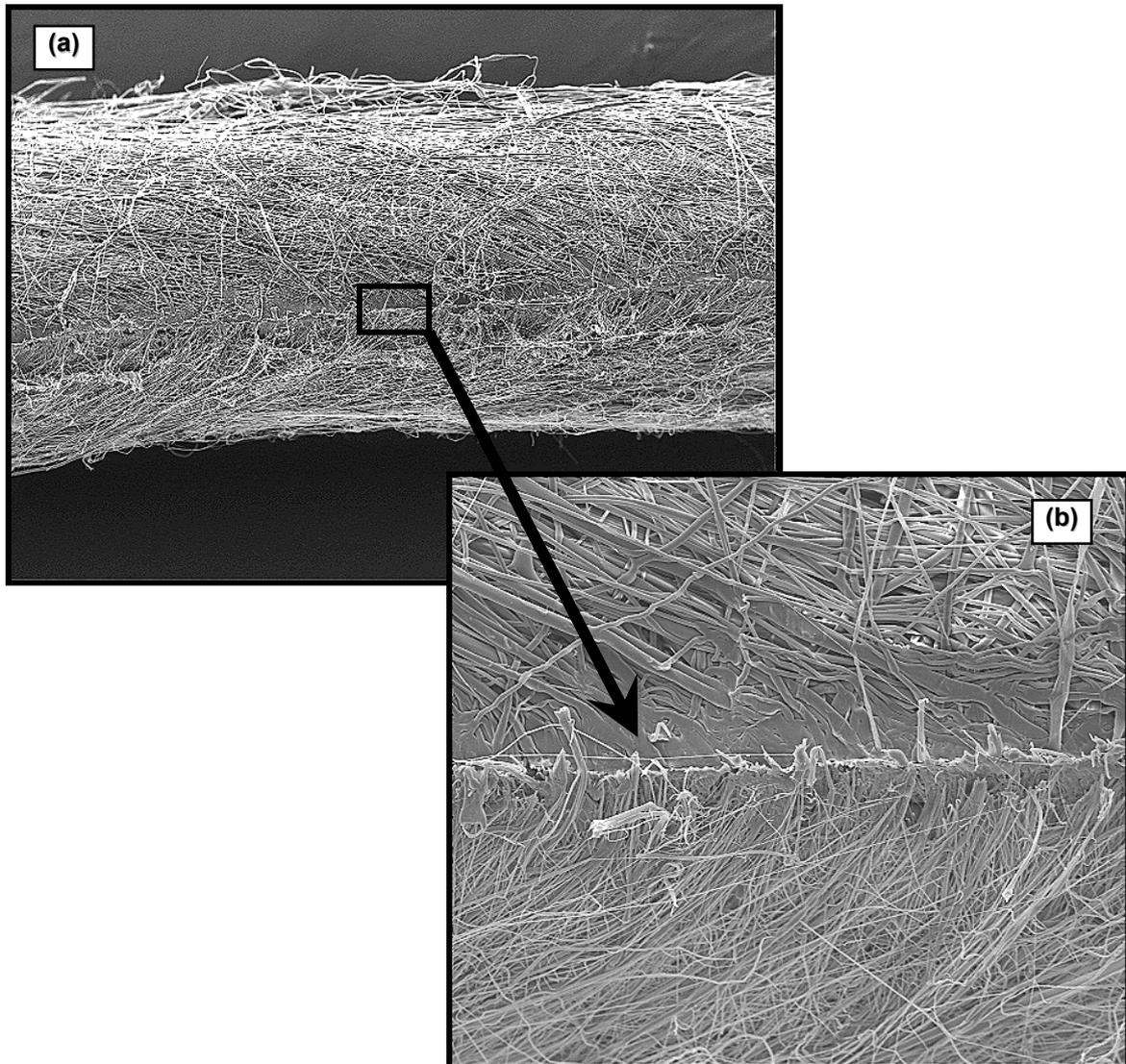
dissolvido. As características e funcionamento desta membrana serão abordados de seguida.



**Figura 3.1** – Fotografia da matriz dupla camada.

#### **3.3.1.3.1. Análise morfológica da matriz DC**

A matriz DC é composta por duas camadas, uma camada com fibras de PET (P) e outra camada com fibras mistas (PQD6). As características morfológicas das matrizes já foram analisadas no capítulo 2 (individualmente). No entanto, foi feita uma observação por SEM do corte transversal da matriz, de modo a verificar se essas características se mantêm e como se distribuem as fibras na camada de transição.



**Figura 3.2** – Imagem SEM do corte transversal da matriz dupla camada: (a) ampliação 61x e (b) ampliação 272x.

Como se pode observar na figura 3.2, a camada inferior da matriz apresenta fibras com menor diâmetro, tal como foi verificado para matriz de PET, enquanto a camada superior apresenta fibras com maior diâmetro, correspondente às fibras mistas PQD6. Na transição entre as duas camadas verifica-se um aumento no diâmetro das fibras. Porém as duas camadas estão unidas.

No processo de filtração do sumo, a matriz DC foi colocada para cima, de modo a que a camada PQD6 fique voltada para o sumo. O objectivo da camada P é reter as

moléculas de quitosano que se dissolvem durante a filtração com o sumo, impedindo que este passe para o filtrado.

#### **3.3.1.4. Tratamento com quitosano em pó (Q)**

Considerando a hipótese do quitosano presente nas matrizes não conseguir actuar como clarificante, quer devido a possíveis alterações químicas ou conformacionais durante a preparação das fibras, quer devido a reduzida acessibilidade causada pela presença de PET, ou ainda por falta de tempo para reagir com os compostos pretendidos, desenvolveu-se um tratamento com quitosano em pó. Neste tratamento, o quitosano possui um tempo prolongado para actuar (2 horas) e o precipitado formado é removido posteriormente por filtração através da matriz de PET.

#### **3.3.1.5. Tratamentos de referência**

Utilizaram-se dois processos de clarificação actualmente usados pela indústria alimentar, como referência e comparação com a filtração usando as matrizes fibrosas desenvolvidas neste estudo: a clarificação por ultrafiltração (UF) e a clarificação com agentes clarificantes (bentonite e gelatina).

#### **3.3.2. Processo de clarificação: observações**

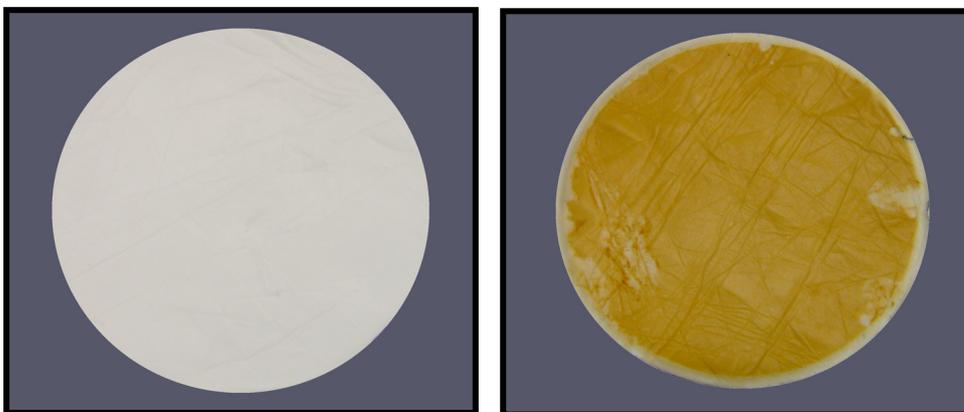
A aplicação de pressões reduzidas permitiu a filtração do sumo de maçã através das membranas produzidas por electrospinning. O fluxo do processo de filtração estava próximo de 100 mL/min. No entanto, no processo de ultrafiltração foi necessário aumentar a pressão até 3,5 bar, para obter um fluxo de cerca de 5 mL/min.

Em todos os tratamentos efectuados verificou-se uma alteração na cor e limpidez do sumo relativamente ao sumo não clarificado, existindo no entanto, diferenças entre os tratamentos. Na figura 3.3 está representado, como exemplo, o sumo de maçã antes e após a clarificação com a matriz P, podendo verificar-se as referidas alterações na cor e turvação.



**Figura 3.3** – Sumo de maçã antes e após a clarificação com a matriz P.

A clarificação verificada no sumo é resultado da retenção de compostos na matriz, o que é evidenciado pelo aspecto da matriz antes e após o tratamento (Figura 3.4).



**Figura 3.4** – Membrana P antes e após o tratamento de clarificação.

### **3.3.3. Análise das características físico-químicas do sumo de maçã antes e após tratamento**

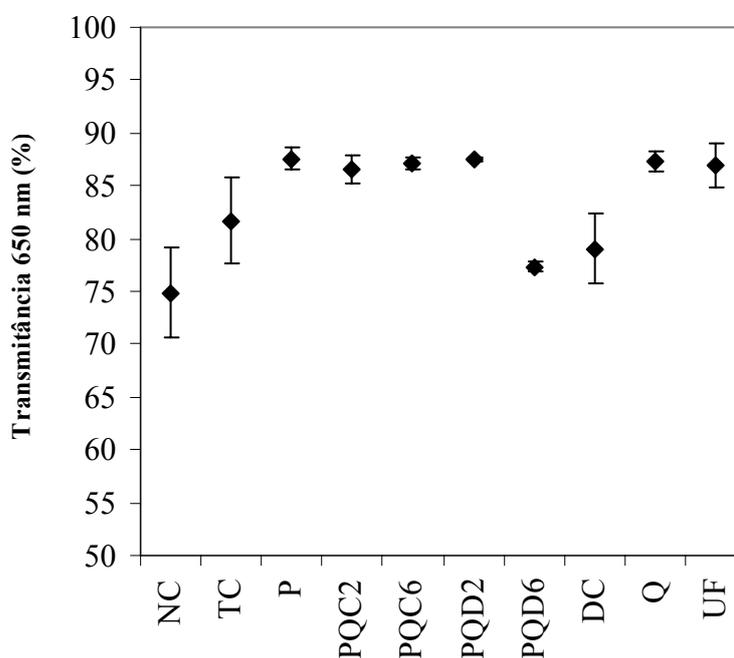
Com o objectivo de avaliar o potencial de aplicação das matrizes obtidas por electrospinning no processo de clarificação do sumo de maçã, foi feita a análise das

propriedades físico-químicas do sumo antes e após os diferentes processos de clarificação. De seguida será feita uma descrição das alterações verificadas.

### 3.3.3.1. Cor e Turbidez

O principal objectivo do processo de clarificação do sumo é obter um aspecto visual que satisfaça as exigências do consumidor. Esse objectivo é conseguido à custa da alteração da sua composição química. O objectivo central do processo de clarificação é, portanto, a obtenção de um sumo com a cor e limpidez pretendidas, garantindo que essas características se mantêm por um período de tempo julgado conveniente.

A turbidez do sumo de maçã pode ser avaliada espectrofotometricamente através do valor da transmitância (%) a 650 nm (Gokmen *et al.* 2001). Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos estão graficamente representados na figura 3.5.



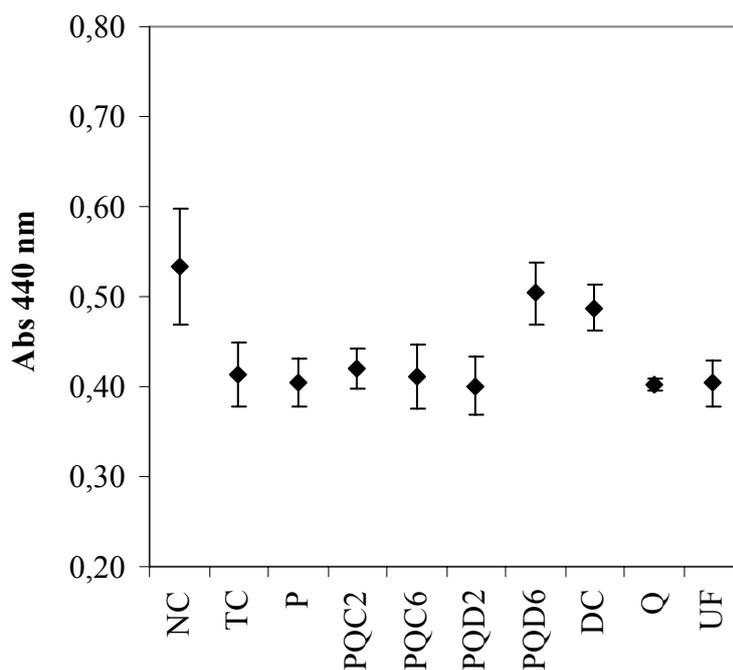
**Figura 3.5** – Representação gráfica da turbidez das amostras de sumo submetido aos diferentes tratamentos.

Verificou-se que, tal como esperado, o sumo não tratado é o que apresenta menor transmitância média no comprimento de onda 650 nm, o que indica que este é o sumo com maior turbidez. A análise estatística demonstrou que na maior parte dos tratamentos estudados ocorreu uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da turbidez, com excepção dos tratamentos TC, PQD6 e DC.

A diminuição da turbidez está associada à eliminação de determinados compostos que provocam turvação, principalmente compostos de elevada massa molecular (proteínas, pectinas) e compostos fenólicos. No tratamento convencional, a bentonite e a gelatina, provocam a precipitação de alguns destes compostos, que são depois removidos por centrifugação. No caso da clarificação por filtração, estes compostos são retidos pela membrana. As membranas produzidas por electrospinning, com excepção das membranas PQD6 e DC, apresentaram, com base neste parâmetro, uma eficácia semelhante à ultrafiltração e superior ao processo convencional.

A elevada turbidez verificada no sumo tratado com a membrana PQD6 já era de certa forma prevista, uma vez que, como foi demonstrado, o quitosano presente nesta matriz solubiliza-se rapidamente por apresentar uma massa molecular bastante reduzida. Ao dissolver-se no sumo, o quitosano pode interagir com alguns compostos formando, por floculação, partículas insolúveis. Estas partículas permanecem em suspensão, causando a turvação do sumo. De modo a eliminar este efeito, foi utilizada a membrana DC, pois esta membrana apresenta uma segunda camada sem quitosano, que pode reter as partículas formadas. No entanto, apesar de se notar uma redução deste efeito, ele não é completamente eliminado, o que demonstra que as moléculas de quitosano D conseguem atravessar a camada de PET (P). Uma segunda alternativa testada consistiu numa floculação prévia com quitosano de maior massa molecular seguida da filtração com matriz P para retenção das partículas formadas (Tratamento Q). Este tratamento promoveu uma diminuição significativa da turbidez.

A diminuição da intensidade da cor é outra característica que se pretende obter com o processo de clarificação. No sumo de maçã essa diminuição é normalmente avaliada com base na absorvância a 440nm.



**Figura 3.6** – Representação gráfica da absorvância (440nm) das amostras de sumo submetido aos diferentes tratamentos.

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de avaliação da cor permitiu concluir que todos os tratamentos promoveram uma diminuição significativa da intensidade da cor do sumo, com exceção dos tratamentos PQD6 e DC ( $p < 0,05$ ). A explicação para a menor eficácia destes dois tratamentos é análoga à referida para o caso da turbidez.

### 3.3.3.2. Sólidos totais, sólidos solúveis, acidez titulável e pH

Na Tabela 3.2 apresentam-se os resultados obtidos na análise de sólidos totais, sólidos solúveis, pH e acidez titulável para as amostras de sumo de maçã submetidas aos diferentes tratamentos de clarificação. Os tratamentos de clarificação estudados não provocaram alterações significativas ao nível dos sólidos solúveis, pH e acidez titulável do sumo ( $p < 0,05$ ). Este resultado já era esperado, pois o processo de clarificação apresenta maior influência, como já foi referido, sobre os compostos de maior massa molecular. Apesar da remoção de alguns compostos, a percentagem de sólidos totais também não variou significativamente com os tratamentos. Este resultado indica que a massa dos compostos retidos é tão pequena, comparativamente à massa total do sumo, que este método não tem

sensibilidade para a sua detecção. A dissolução de alguns agentes clarificantes no sumo poderá compensar a perda de massa devido à retenção de alguns compostos presentes no sumo, o que também contribui para esse resultado.

**Tabela 3.2** – Resultados obtidos na análise de sólidos totais, sólidos solúveis, pH e acidez titulável das amostras de sumo de maçã submetidas aos diferentes tratamentos de clarificação.

<b>Tratamento</b>	<b>Sólidos totais (%)</b>	<b>Sólidos solúveis (°Brix)</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez Titulável (g ácido málico/ 100 mL)</b>
NC	13,1 ± 0,6	14,5 ± 0,4	3,76 ± 0,06	0,33 ± 0,03
TC	13,2 ± 0,6	14,5 ± 0,5	3,85 ± 0,07	0,32 ± 0,03
P	13,1 ± 0,7	14,4 ± 0,5	3,76 ± 0,06	0,32 ± 0,02
PQC2	13,2 ± 0,7	14,4 ± 0,5	3,65 ± 0,06	0,33 ± 0,03
PQC6	13,1 ± 0,7	14,5 ± 0,5	3,75 ± 0,06	0,33 ± 0,02
PQD2	13,4 ± 0,5	14,5 ± 0,5	3,87 ± 0,02	0,33 ± 0,02
PQD6	13,5 ± 0,4	14,4 ± 0,5	3,73 ± 0,04	0,33 ± 0,02
DC	13,0 ± 0,2	14,3 ± 0,2	3,72 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Q	13,1 ± 0,3	14,7 ± 0,2	3,92 ± 0,16	0,34 ± 0,02
UF	13,0 ± 0,2	14,2 ± 0,2	3,85 ± 0,18	0,35 ± 0,01

### **3.3.3.3. Ácidos orgânicos e açúcares**

Para verificar de que modo os tratamentos de clarificação afectam a composição de ácidos orgânicos e açúcares, foi efectuada uma análise por HPLC dos ácidos orgânicos e açúcares maioritariamente encontrados na maçã.

Relativamente aos ácidos orgânicos verificou-se que o sumo de maçã estudado apresentava na sua composição, essencialmente, ácido málico e ácido oxálico. A composição do sumo relativamente a estes dois compostos não foi significativamente alterada após os diversos tratamentos de clarificação (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3** – Resultados obtidos na análise de ácidos orgânicos das amostras de sumo de maçã submetidos aos diferentes tratamentos de clarificação.

Tratamento	Concentração de ácido orgânico (g/L)			
	Ácido málico	Ácido oxálico	Ácido láctico	Ácido cítrico
NC	9,71	0,14	n.d.	n.d.
TC	9,85	0,10	n.d.	n.d.
P	9,80	0,13	n.d.	n.d.
PQC2	9,75	0,13	n.d.	n.d.
PQC6	9,71	0,14	n.d.	n.d.
PQD2	9,78	0,14	n.d.	n.d.
PQD6	9,82	0,16	n.d.	n.d.
DC	9,83	0,14	n.d.	n.d.
Q	9,76	0,09	n.d.	n.d.
UF	9,80	0,18	n.d.	n.d.

( n.d. – não detectado)

Não foram verificadas alterações significativas das quantidades de glucose, sacarose e frutose no sumo de maçã após os diferentes tratamentos de clarificação. Os resultados obtidos encontram-se sumariados na tabela 3.4.

**Tabela 3.4** – Resultados obtidos na análise de açúcares das amostras de sumo de maçã submetidos aos diferentes tratamentos de clarificação

Tratamento	Concentração de açúcar (g/L)		
	Fructose	Glucose	Sacarose
NC	90,4	37,2	11,6
TC	91,3	35,2	12,3
P	89,9	33,6	10,9
PQC2	89,9	34,4	11,7
PQC6	89,9	34,8	11,4
PQD2	90,8	33,8	12,3
PQD6	91,3	35,5	11,7
DC	92,3	36,0	12,0
Q	92,6	38,8	11,7
UF	94,8	33,7	13,1

#### **3.3.3.4. Compostos fenólicos**

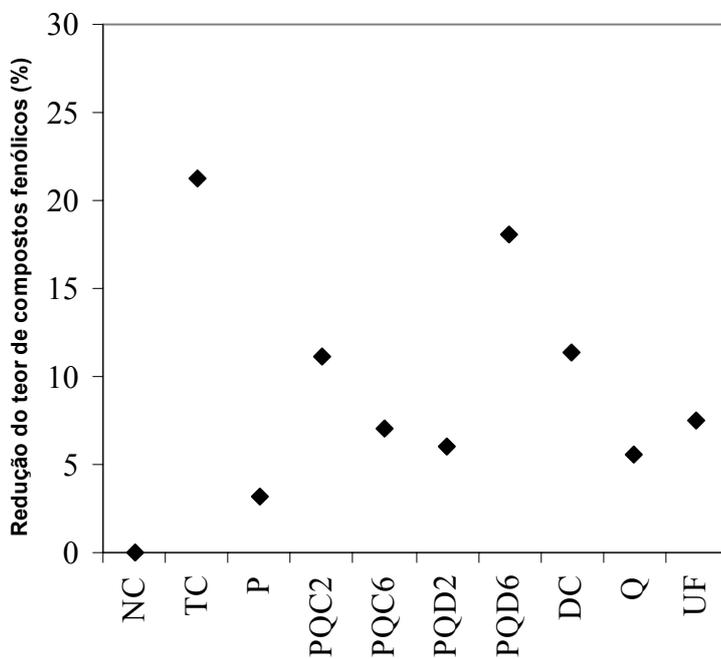
A composição fenólica é um parâmetro importante a ser analisado durante o estudo do processo de clarificação. Os compostos fenólicos apresentam uma grande influência nas características visuais do sumo de maçã, tais como a cor e a turvação. Estes compostos podem actuar como substratos da polifenol oxidase, o que provoca o acastanhamento do sumo, e/ou sofrerem reacções de polimerização que originam o aumento da turvação. Assim, estes compostos apresentam uma forte influência na qualidade e aceitabilidade do sumo de maçã.

Neste trabalho, visto tratar-se de uma primeira abordagem do estudo de novas técnicas de clarificação, apenas foi analisada a concentração de compostos fenólicos totais no sumo, antes e após cada tratamento.

Na tabela 3.5 apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de compostos fenólicos totais nos sumos analisados. Estes resultados foram obtidos, assim como para as restantes análises, para três diferentes amostras de sumo, preparadas e tratadas em diferentes dias. Verifica-se que mesmo a concentração inicial de fenólicos no sumo (NC) varia consideravelmente, o que poderá estar associado quer às características das maçãs utilizadas (p.ex., diferenças no estado de maturação do fruto) quer a diferenças de extração durante o processamento. Este facto causa alguns problemas de comparação da eficiência dos diferentes tratamentos. Deste modo, foi efectuado o cálculo da percentagem de redução do teor de fenólicos totais, de modo a tornar os diferentes tratamentos comparáveis, para os três ensaios realizados. Os resultados obtidos estão representados na figura 3.7.

**Tabela 3.5** – Concentração de fenólicos totais das amostras de sumo de maçã submetidos aos diferentes tratamentos de clarificação.

Tratamento	Concentração de fenólicos
NC	0,13 ± 0,03
TC	0,11 ± 0,04
P	0,13 ± 0,03
PQC2	0,12 ± 0,04
PQC6	0,12 ± 0,03
PQD2	0,13 ± 0,03
PQD6	0,11 ± 0,02
DC	0,11 ± 0,02
Q	0,11 ± 0,02
UF	0,11 ± 0,02



**Figura 3.7** – Representação gráfica da percentagem de redução do teor de fenólicos totais das amostras de sumo submetidas aos diferentes tratamentos.

A análise estatística da redução do teor de fenólicos totais revelou a ocorrência de uma diminuição significativa destes compostos com os tratamentos TC, PQD2, PQD6, DC, Q e UF. Nos restantes tratamentos a diminuição verificada não é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Os agentes clarificantes, como a bentonite, a gelatina e o quitosano, possuem a capacidade de se ligar aos compostos fenólicos, provocando uma diminuição da sua concentração. Na ultrafiltração, esta diminuição é devido à retenção destes compostos na membrana.

As matrizes produzidas por electrospinning poderiam combinar estes dois factores. No entanto, verificou-se que o diâmetro dos poros destas matrizes não permite uma retenção significativa destes compostos, o que é demonstrado pelo resultado obtido para matriz P. Assim, a retenção destes compostos fica limitada, essencialmente, à possível acção do quitosano. As matrizes com quitosano de maior massa molecular não promoveram uma diminuição significativa da concentração destes compostos, o que poderá estar associado à baixa disponibilidade das moléculas de quitosano para se ligarem a outros compostos, por se encontrarem incorporadas na fibra de PET, como foi explicado no capítulo anterior. Desta forma, os grupos funcionais do quitosano não conseguem estabelecer interações com os compostos fenólicos. Por outro lado, o quitosano de menor massa molecular, presente nas matrizes PQD2, PQD6 e DC, por passar para a solução, consegue interagir com os compostos fenólicos, provocando a diminuição da sua concentração no sumo. No entanto, esta diminuição não é real, já que o quitosano dissolve-se durante a filtração e, em solução, estabelecerá a ligação aos compostos fenólicos. Assim os compostos fenólicos não são detectados pelo método de Folin – Ciocalteu, apesar de estarem presentes no sumo, pois estão associados ao quitosano, o que explica a turvação relatada anteriormente (§ 3.3.3.1)

O processo de clarificação com o quitosano em pó poderá ser uma solução para este problema, uma vez que o quitosano pode actuar sobre estes compostos e formar complexos insolúveis, que serão removidos durante a filtração pela matriz P. Este foi o único dos tratamentos desenvolvidos capaz de promover uma diminuição do teor de fenólicos totais comparável à ultrafiltração (UF).

Os compostos fenólicos presentes em plantas incluem uma grande diversidade de compostos, nomeadamente fenóis simples, fenilpropanóides, derivados do ácido benzóico,

flavonóides e taninos entre outros. Nem todos estes compostos promovem alteração da cor e turvação do sumo. Para além disso, muitos compostos fenólicos apresentam propriedades benéficas, ao nível nutricional e sensorial (Shahidi & Naczki 2004). Assim, uma remoção selectiva de compostos fenólicos constituiria uma vantagem para o processo de clarificação. A análise do teor de fenólicos totais é portanto, por si só, uma avaliação incompleta, sendo importante um estudo mais aprofundado desta matéria, nomeadamente uma análise qualitativa da variação da composição fenólica do sumo com os diferentes tratamentos.

### **3.3.3.5. Proteínas**

Como foi referido anteriormente, durante o armazenamento, as proteínas presentes no sumo de maçã podem reagir com outros compostos (compostos fenólicos, por exemplo) causando turvação. Deste modo, a remoção de proteínas durante o processo de clarificação é um factor positivo. O teor de proteína num sumo é bastante reduzido, pelo que a remoção deste tipo de constituinte não constitui uma desvantagem do ponto de vista nutricional.

Na tabela 3.6 apresentam-se os resultados obtidos para a concentração de proteínas nos sumos analisados.

**Tabela 3.6** – Concentração de proteína nas amostras de sumo de maçã submetidos aos diferentes tratamentos de clarificação

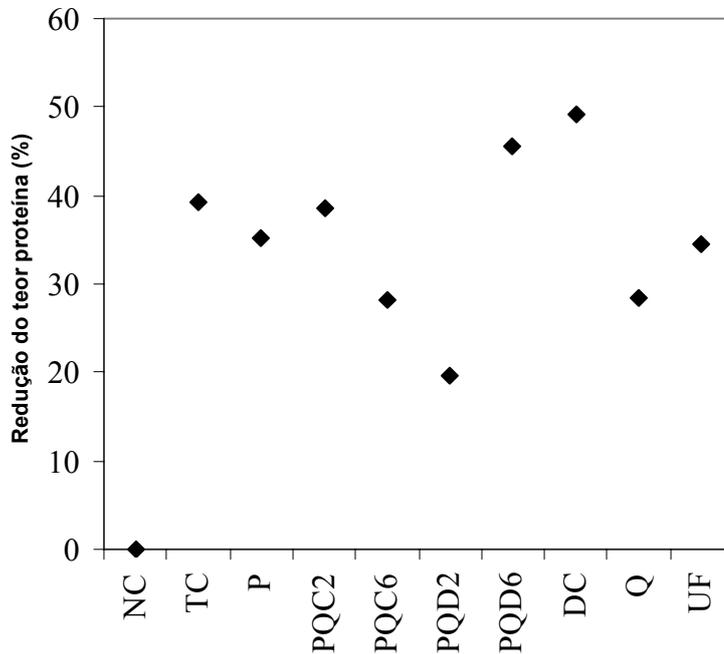
<b>Tratamento</b>	<b>Concentração de proteína solúvel (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>		
<b>NC</b>	183	$\pm$	21
<b>TC</b>	114	$\pm$	54
<b>P</b>	120	$\pm$	39
<b>PQC2</b>	112	$\pm$	13
<b>PQC6</b>	131	$\pm$	19
<b>PQD2</b>	148	$\pm$	29
<b>PQD6</b>	101	$\pm$	33
<b>DC</b>	101	$\pm$	40
<b>Q</b>	141	$\pm$	46
<b>UF</b>	130	$\pm$	53

Verificou-se que, tanto para o sumo não clarificado como para o sumo obtido a partir dos diferentes tratamentos, existe uma grande variação da concentração de proteínas nos diferentes ensaios realizados, o que origina desvios padrão muito elevados, como se pode verificar na tabela 3.7. Apesar das variações intra-tratamento serem muito elevadas, foi possível verificar, estatisticamente, que existe uma redução significativa do teor de proteínas para todos os tratamentos estudados ( $p < 0,05$ ).

A diminuição do teor de proteínas ocorre por dois mecanismos: retenção na membrana de filtração, uma vez que se trata de compostos com massa molecular elevada, ou interacção química com agentes clarificantes.

As matrizes com quitosano de menor massa molecular apresentam o problema de precipitar as proteínas apenas ao se dissolver no sumo, o que gera turvação. Este problema é semelhante ao descrito para o caso dos compostos fenólicos. A solução passa novamente pelo tratamento prévio do sumo com quitosano, seguida da filtração com a matriz P.

Na figura 3.8 está representada graficamente a redução do teor de proteínas com os tratamentos de clarificação utilizados.



**Figura 3.8** – Representação gráfica da percentagem de redução do teor de proteínas nas amostras de sumo submetido aos diferentes tratamentos.

### **3.4. Conclusões**

Os ensaios realizados permitiram verificar que as matrizes obtidas por electrospinning apresentam potencial para aplicação na clarificação do sumo de maçã pois, de modo geral, promovem a redução da cor, turbidez, teor de fenólicos totais e teor de proteína do sumo de maçã. Estas membranas apresentam algumas vantagens face ao processo de clarificação tradicional e ultrafiltração, nomeadamente:

- ✓ Comparativamente ao tratamento convencional, estas membranas apresentam vantagens do ponto de vista económico, uma vez que há uma redução do tempo de processamento e do consumo energético. Apresentam ainda a vantagem de não recorrer a agentes clarificantes tradicionais, que muitas vezes causam alterações sensoriais não desejadas;
- ✓ Relativamente ao processo de ultrafiltração, a grande vantagem das membranas produzidas por electrospinning é a redução da necessidade de aplicação de elevadas pressões, bem como o tempo necessário para o processo de clarificação, o que se traduz numa vantagem económica;
- ✓ O processo de produção de membranas por electrospinning é bastante simples, económico, rápido e facilmente ampliado para uma escala industrial. O custo destas membranas será provavelmente bastante inferior ao custo de membranas de ultrafiltração.

No entanto, alguns problemas foram registados e o desenvolvimento de soluções constitui um desafio a ser ultrapassado, para a utilização destas membranas na clarificação de sumos:

- ✗ A matriz com quitosano de maior massa molecular não apresentou diferença relativamente à matriz constituída apenas por PET (matriz P). Este resultado indica que o quitosano está de tal forma fixo à fibra que não apresenta disponibilidade para actuar como clarificante;

✘ Por outro lado, o quitosano de menor massa molecular presente na matriz é capaz de reagir com compostos fenólicos e proteínas. No entanto, esta interação apenas ocorre em solução e a turvação permanece. Parece portanto difícil conjugar a imobilização do quitosano na matriz com a capacidade de acção como clarificante. Numa primeira abordagem a solução para este problema foi conseguida por tratamento prévio do sumo com quitosano, seguido de filtração com a matriz P. No entanto, este tratamento implica um passo adicional no processo de clarificação, o que constitui uma desvantagem em termos industriais. Outras soluções podem passar por melhoramentos da matriz DC (aumento da espessura da camada P, manipulações no sistema de electrospinning de modo a produzir poros com menor diâmetro, etc.) ou pelo tratamento químico da matriz PQD6 de modo a insolubilizar o quitosano presente, sem porém alterar a sua capacidade clarificante;

✘ As membranas de ultrafiltração apresentam uma uniformidade no tamanho de poros que permite garantir que compostos acima de uma determinada massa molecular não são permeáveis. No entanto, tal não acontece com as membranas produzidas por electrospinning, devido à heterogeneidade do diâmetro e orientação das fibras, como foi verificado. Este problema apenas pode ser solucionado com o melhoramento do sistema de electrospinning, nomeadamente design e movimento do colector, utilização de um sistema de injeção de solução mais amplo que uma bomba de seringa, controlo das condições atmosféricas (humidade e temperatura) durante o processo, entre outros.

## **Considerações finais**

A realização deste trabalho permitiu...

- ✓ Uma maior compreensão do funcionamento do processo de electrospinning nomeadamente, o efeito de alguns parâmetros que o influenciam, como é o caso da composição do solvente e da concentração da solução.
- ✓ A optimização da produção de nanofibras de PET, de modo a obter-se uma matriz fibrosa com características morfológicas melhoradas, que se adaptem a necessidades específicas de determinadas aplicações.
- ✓ Através de manipulações da massa molecular do quitosano, encontrar condições que permitam a sua solubilização com outro polímero, o PET, numa mesma solução que pode então ser utilizada para a produção de matrizes mistas por electrospinning.
- ✓ O desenvolvimento de matrizes mistas, compostas por um polímero sintético, o PET, que confere a matriz uma estrutura fibrosa tridimensional, e um biopolímero, o quitosano, o qual pode conferir uma funcionalidade acrescida a matriz.
- ✓ Verificar que na matriz mista os dois polímeros, PET e quitosano, se distribuem de forma diferenciada, sendo que o PET ocupa zona central da fibra e o quitosano ocupa uma região externa, formando um revestimento.
- ✓ Avaliar o efeito da presença de quitosano na matriz de PET, nomeadamente a sua influência nas características morfológicas e mecânicas da matriz e compreender de que forma a variação da massa molecular e da concentração do quitosano afecta estas propriedades.
- ✓ Averiguar a solubilidade das matrizes mistas em água e em solução ácida, um parâmetro importante para diversas aplicações.

- ✓ Estudar o potencial da aplicação destas matrizes no processo de clarificação de sumos, um passo essencial para o desenvolvimento de um novo processo de clarificação.
  
- ✓ Compreender alguns problemas que necessitam de ser ultrapassados, de modo a tornar as matrizes mistas eficazes na clarificação do sumo de maçã.



## **Referências Bibliográficas**

- Bhattacharai, N., D. Edmondson, O. Veiseh, F. A. Matsen and M. Q. Zhang (2005). "*Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility.*" *Biomaterials* 26(31): 6176-6184.
- Bhattacharai, N., Z. S. Li, D. Edmondson and M. Q. Zhang (2006). "*Alginate-based nanofibrous scaffolds: Structural, mechanical, and biological properties.*" *Advanced Materials* 18(11): 1463-1467.
- Bognitzki, M., W. Czado, T. Frese, A. Schaper, M. Hellwig, M. Steinhart, A. Greiner and J. H. Wendorff (2001). "*Nanostructured fibers via electrospinning.*" *Advanced Materials* 13(1): 70-72.
- Bornet, A. and P. L. Teissedre (2005). "*Applications and interest of chitin, chitosan and their derivatives in enology.*" *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin* 39(4): 199-207.
- Buchko, C. J., L. C. Chen, Y. Shen and D. C. Martin (1999). "*Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films.*" *Polymer* 40(26): 7397-7407.
- Buttafoco, L., N. G. Kolkman, P. Engbers-Buijtenhuijs, A. A. Poot, P. J. Dijkstra, I. Vermes and J. Feijen (2006). "*Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications.*" *Biomaterials* 27(5): 724-734.
- Cabrera, J. C. and P. Van Cutsem (2005). "*Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan.*" *Biochemical Engineering Journal* 25(2): 165-172.
- Chatterjee, S., S. Chatterjee, B. P. Chatterjee and A. K. Guha (2004). "*Clarification of fruit juice with chitosan.*" *Process Biochemistry* 39(12): 2229-2232.
- Chew, S. Y., J. Wen, E. K. F. Yim and K. W. Leong (2005). "*Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers.*" *Biomacromolecules* 6(4): 2017-2024.
- Dalton, P. D., D. Klee and M. Moller (2005). "*Electrospinning with dual collection rings.*" *Polymer* 46(3): 611-614.
- de Bruijn, J., A. Venegas and R. Borquez (2002). "*Influence of crossflow ultrafiltration on membrane fouling and apple juice quality.*" *Desalination* 148(1-3): 131-136.
- de Bruijn, J. P. F., A. Venegas, J. A. Martinez and R. Borquez (2003). "*Ultrafiltration performance of Carbosep membranes for the clarification of apple juice.*" *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 36(4): 397-406.
- Ding, B., H. Y. Kim, S. C. Lee, C. L. Shao, D. R. Lee, S. J. Park, G. B. Kwag and K. J. Choi (2002). "*Preparation and characterization of a nanoscale poly(vinyl alcohol)*"

- fiber aggregate produced by an electrospinning method.*" Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics 40(13): 1261-1268.
- Duan, B., C. H. Dong, X. Y. Yuan and K. D. Yao (2004). "*Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide).*" Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition 15(6): 797-811.
- Dutta, P. K., M. N. Ravikumar and J. Dutta (2002). "*Chitin and chitosan for versatile applications.*" Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews C42(3): 307-354.
- Geng, X. Y., O. H. Kwon and J. H. Jang (2005). "*Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution.*" Biomaterials 26(27): 5427-5432.
- Girard, B. and L. R. Fukumoto (1999). "*Apple juice clarification using microfiltration and ultrafiltration polymeric membranes.*" Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 32(5): 290-298.
- Gokmen, V., N. Artik, J. Acar, N. Kahraman and E. Poyrazoglu (2001). "*Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice.*" European Food Research and Technology 213(3): 194-199.
- Gokmen, V. and O. Cetinkaya (2007). "*Effect of pretreatment with gelatin and bentonite on permeate flux and fouling layer resistance during apple juice ultrafiltration.*" Journal of Food Engineering 80(1): 300-305.
- Gopal, R., S. Kaur, Z. W. Ma, C. Chan, S. Ramakrishna and T. Matsuura (2006). "*Electrospun nanofibrous filtration membrane.*" Journal of Membrane Science 281(1-2): 581-586.
- Jiang, H. L., D. F. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu and W. L. Chen (2004). "*Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning.*" Biomacromolecules 5(2): 326-333.
- Ki, C. S., D. H. Baek, K. D. Gang, K. H. Lee, I. C. Um and Y. H. Park (2005). "*Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution.*" Polymer 46(14): 5094-5102.
- Kim, E. Y., J. S. Kong, S. K. An and H. D. Kim (2000). "*Surface modification of polymers and improvement of the adhesion between evaporated copper metal film and a polymer. I. Chemical modification of PET.*" Journal of Adhesion Science and Technology 14(9): 1119-1130.
- Kisko, G., R. Sharp and S. Roller (2005). "*Chitosan inactivates spoilage yeasts but enhances survival of Escherichia coli O157 : H7 in apple juice.*" Journal of Applied Microbiology 98(4): 872-880.

- Kittur, F. S., A. B. V. Kumar, L. R. Gowda and R. N. Tharanathan (2003). "*Chitosanolytic activity of a pectinase isozyme of Aspergillus niger - A non-specific activity.*" Carbohydrate Polymers 53(2): 191-196.
- Kumar, A. B. V. and R. N. Tharanathan (2004). "*A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes.*" Carbohydrate Polymers 58(3): 275-283.
- Li, J., Z. F. Wang, Y. Q. Ge, Q. F. Sun and X. S. Hu (2006). "*Clarification and sterilization of raw depectinized apple juice by ceramic ultrafiltration membranes.*" Journal of the Science of Food and Agriculture 86(1): 148-155.
- Li, J. X., A. H. He, C. C. Han, D. F. Fang, B. S. Hsiao and B. Chu (2006). "*Electrospinning of hyaluronic acid (HA) and HA/gelatin blends.*" Macromolecular Rapid Communications 27(2): 114-120.
- Li, L. and Y. L. Hsieh (2006). "*Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers.*" Carbohydrate Research 341(3): 374-381.
- Lin, T., J. Fang, H. X. Wang, T. Cheng and X. G. Wang (2006). "*Using chitosan as a thickener for electrospinning dilute PVA solutions to improve fibre uniformity.*" Nanotechnology 17(15): 3718-3723.
- Ma, Z., M. Kotaki, T. Yong, W. He and S. Ramakrishna (2005). "*Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering.*" Biomaterials 26(15): 2527-2536.
- Matthews, J. A., E. D. Boland, G. E. Wnek, D. G. Simpson and G. L. Bowlin (2003). "*Electrospinning of collagen type II: A feasibility study.*" Journal of Bioactive and Compatible Polymers 18(2): 125-134.
- Matthews, J. A., G. E. Wnek, D. G. Simpson and G. L. Bowlin (2002). "*Electrospinning of collagen nanofibers.*" Biomacromolecules 3(2): 232-238.
- McCann, J. T., D. Li and Y. N. Xia (2005). "*Electrospinning of nanofibers with core-sheath, hollow, or porous structures.*" Journal of Materials Chemistry 15(7): 735-738.
- McLellan, M. R. and O. Padilla-Zakour (2005). *Juice processing. Processing Fruits Science and Technology* C. P. LLC.
- Min, B. M., S. W. Lee, J. N. Lim, Y. You, T. S. Lee, P. H. Kang and W. H. Park (2004). "*Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers.*" Polymer 45(21): 7137-7142.
- Ohgo, K., C. H. Zhao, M. Kobayashi and T. Asakura (2003). "*Preparation of non-woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method.*" Polymer 44(3): 841-846.

- Ohkawa, K., D. I. Cha, H. Kim, A. Nishida and H. Yamamoto (2004). "*Electrospinning of chitosan.*" *Macromolecular Rapid Communications* 25(18): 1600-1605.
- Park, W. H., L. Jeong, D. I. Yoo and S. Hudson (2004). "*Effect of chitosan on morphology and conformation of electrospun silk fibroin nanofibers.*" *Polymer* 45(21): 7151-7157.
- Ramakrishna, S., K. Fujihara, W. Teo, T. Lim and Z. Ma (2005). *An introduction to electrospinning and nanofibers*, World Scientific Publishing Co Pte. Ltd.
- Rho, K. S., L. Jeong, G. Lee, B. M. Seo, Y. J. Park, S. D. Hong, S. Roh, J. J. Cho, W. H. Park and B. M. Min (2006). "*Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing.*" *Biomaterials* 27(8): 1452-1461.
- Rosen, S. L. (1982). *Fundamental principles of polymeric materials*. New York, John Wiley & Sons.
- Rungsardthong, V., N. Wonputtanakul, N. Kongpien and P. Chotiwaranon (2006). "*Application of fungal chitosan for clarification of apple juice.*" *Process Biochemistry* 41(3): 589-593.
- Shahidi, F. and M. Naczk (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, CRC Press LLC.
- Singh, N. L., N. Shah, C. F. Desai, K. P. Singh and S. K. Arora (2004). "*Modification of polyethylene terephthalate by proton irradiation.*" *Radiation Effects and Defects in Solids* 159(8-9): 475-482.
- Smit, E., U. Buttner and R. D. Sanderson (2005). "*Continuous yarns from electrospun fibers.*" *Polymer* 46(8): 2419-2423.
- Spasova, M., N. Manolova, D. Paneva and I. Rashkov (2004). "*Preparation of chitosan-containing nanofibres by electrospinning of chitosan/poly(ethylene oxide) blend solutions.*" *E-Polymers*.
- Subramanian, A., D. Vu, G. F. Larsen and H. Y. Lin (2005). "*Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential applications in cartilage tissue engineering.*" *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 16(7): 861-873.
- Tan, S. H., R. Inai, M. Kotaki and S. Ramakrishna (2005). "*Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process.*" *Polymer* 46(16): 6128-6134.
- Theron, S. A., E. Zussman and A. L. Yarin (2004). "*Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions.*" *Polymer* 45(6): 2017-2030.

- Tommeraas, K., Varum, K. M., Christensen, B. E., Smidsrod, O. (2001). "*Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosan.*" Carbohydrate Research 333: 137–144.
- Wannatong, L., A. Sirivat and P. Supaphol (2004). "*Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene.*" Polymer International 53(11): 1851-1859.
- Woerdeman, D. L., P. Ye, S. Shenoy, R. S. Parnas, G. E. Wnek and O. Trofimova (2005). "*Electrospun fibers from wheat protein: Investigation of the interplay between molecular structure and the fluid dynamics of the electrospinning process.*" Biomacromolecules 6(2): 707-712.
- Xie, J. B. and Y. L. Hsieh (2003). "*Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: casein and lipase enzyme.*" Journal of Materials Science 38(10): 2125-2133.
- Yang, Y., Z. D. Jia, Q. Li and Z. C. Guan (2006). "*Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polyethylene oxide solution.*" Ieee Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation 13(3): 580-585.
- Yi, F., Z. X. Guo, P. Hu, Z. X. Fang, J. Yu and Q. Li (2004). "*Mimetics of eggshell membrane protein fibers by electrospinning.*" Macromolecular Rapid Communications 25(10): 1038-1043.
- Youn, K. S., J. H. Hong, D. H. Bae, S. J. Kim and S. D. Kim (2004). "*Effective clarifying process of reconstituted apple juice using membrane filtration with filter-aid pretreatment.*" Journal of Membrane Science 228(2): 179-186.
- Yuan, X. Y., Y. Y. Zhang, C. H. Dong and J. Sheng (2004). "*Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning.*" Polymer International 53(11): 1704-1710.
- Zhang, Y. Z., J. Venugopal, Z. M. Huang, C. T. Lim and S. Ramakrishna (2006). "*Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers.*" Polymer 47(8): 2911-2917.
- Zhou, Y. S., D. Z. Yang and J. Nie (2006). "*Electrospinning of chitosan/poly(vinyl alcohol)/acrylic acid aqueous solutions.*" Journal of Applied Polymer Science 102(6): 5692-5697.