

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico

Ana Margarida Moreira de Sousa



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Departamento de Engenharia Química

Orientador na FEUP: **Professora Doutora Pilar Gonçalves**

Julho de 2008

"When it comes to making the decision to change your lifestyle and start acting green, most people are hesitant to take that first step towards going the road less traveled. Many think that it will be more of a chore than a self-fulfilling act, or even worse, that only one person can't possibly make a difference. It's thoughts like these that stop the progression towards improving our environment, and ultimately threatens our future as residents here on Earth. If we don't stop this selfish train of thought and start acting green, then it is certain that we will permanently tarnish the only planet we have to call home."

(Ecoendure, Empresa Norte-americana produtora de filmes biodegradáveis)

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas que, de certo modo, contribuíram para o desenvolvimento e sucesso deste projecto.

À Professora Doutora Maria do Pilar Figueroa Gonçalves o meu agradecimento especial. Pela confiança depositada e conhecimentos científicos transmitidos ao longo do trabalho, e que foram fundamentais para a minha motivação e execução do mesmo. Pela forma como sempre se mostrou disponível, sempre prestável tanto a nível pessoal e profissional.

Ao Doutor Ronald Villanueva por se ter revelado um excelente colega de trabalho, com o qual aprendi imenso e que se demonstrou sempre disponível para ajudar. Acima de tudo, por se ter revelado um bom amigo que sempre me procurou motivar e encorajar durante o desenvolvimento do projecto.

Ao Doutor Loic Hilliou, pelo apoio, orientação e disponibilidade prestados ao longo do desenvolvimento deste projecto.

Ao Doutor Fábio D.S. Larotonda pela disponibilidade prestada, apoio e documentação cedida.

Ao Professor Doutor Rui Boaventura pela simpatia e pela disponibilização do seu laboratório para o desenvolvimento do estudo referente à bio sorção de metais pesados pelo resíduo da alga *G.vermiculophylla*.

Ao Doutor Vitor Vilar pela ajuda preciosa prestada na realização do mesmo estudo. Pelos conhecimentos que me transmitiu que foram cruciais na realização e compreensão desta etapa do projecto.

À Hiléia e Ana Carla por se terem revelado excelentes colegas de laboratório, sempre prestáveis e prontas a ajudar. Trabalhar com pessoas excepcionais torna tudo mais fácil e agradável!

Ao Professor Doutor Sebastião Feyo pelo financiamento da minha inscrição no XXI Encontro Nacional SPQ, Química e Inovação, ocorrido de 11 a 13 de Junho de 2008, permitindo a divulgação do projecto desenvolvido.

Ao Doutor Rui Pereira por toda a ajuda prestada e pela cedência da matéria-prima que permitiu a realização do trabalho em questão.

À Dona Maria do Céu Lopes do Laboratório de Ambiente do Departamento de Engenharia Química da FEUP pela amabilidade e ajuda prestada na preparação do resíduo da alga para a realização do estudo da biossorção de metais pesados.

Ao Jerónimo, pelo apoio, encorajamento e sobretudo pela paciência o meu muito obrigado.

Um agradecimento especial à minha família, pela paciência e encorajamento nas horas mais difíceis.

Resumo

A *Gracilaria* é um género de alga vermelha da qual podemos extrair um biopolímero designado por agar que é extensamente utilizado nas indústrias alimentar e farmacêutica como agente gelificante e estabilizante. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos muitos estudos no sentido de melhor conhecer as propriedades dos géis deste biopolímero; porém, poucos são os estudos reportados sobre a aplicação do agar em biofilmes. Os objectivos deste trabalho incluem a optimização do processo de extracção do biopolímero agar da alga *G.vermiculophylla* e o estudo das possíveis aplicações industriais do produto obtido em três vertentes distintas: produção de géis, filmes biodegradáveis e ainda, a utilização do resíduo obtido do processo de extracção na remoção de metais pesados por um processo de bio sorção num sistema batch. Foram estudados separadamente, e optimizados em termos de rendimento, força do gel, temperaturas de gelificação e fusão, e teores em sulfato e 3,6-anidrogactose, o efeito do pré-tratamento (PT) alcalino (duração e concentração de NaOH) e o tempo de extracção no processo de obtenção do agar. O PT foi avaliado segundo um modelo estatístico “full factorial”. O maior rendimento e força de gel foram obtidos para um PT de 3,5h e uma concentração de NaOH de 6%, e portanto, a posterior optimização da extracção foi realizada sob estas condições de PT. Para as extracções obteve-se um produto com melhor qualidade para um tempo de extracção de 2h. A partir de soluções optimizadas de agar fizeram-se filmes recorrendo à técnica de “knife coating”. Com o intuito de caracterizar os filmes obtidos, foram realizados estudos das suas propriedades físicas tais como: higroscopicidade, resistência mecânica (módulo de Young, forças de tensão e deformação) e permeabilidade ao vapor de água e ao oxigénio. Os filmes obtidos foram transparentes e homogéneos, apresentando características idênticas aos filmes de agar comercial. Foi ainda estudada a capacidade de bio sorção de Pb(II) pelo resíduo resultante da extracção optimizada, a pH e temperatura constantes. Os dados de equilíbrio obtidos foram ajustados a modelos de equilíbrio conhecidos de forma a ser determinada a capacidade máxima de bio sorção do resíduo da *G. vermiculophylla*. Considerando a abundância de matéria-prima, o seu baixo custo e a qualidade do agar extraído, o uso comercial da *G.vermiculophylla* é plenamente justificado.

Palavras-chave: *Gracilaria vermiculophylla*, agar, géis, filmes biodegradáveis, bio sorção

Abstract

Gracilaria is a red algal genus that synthesizes a biopolymer called agar that is extensively used in food and pharmaceutical industry as gelling and stabilizing agent. In the last years, many studies have focused on gel properties of this biopolymer; but the agar films still have few studies reported. The objectives of this work included the optimization of the agar extraction from *Gracilaria vermiculophylla*, production of gels, biodegradable films and the determination of the heavy metal biosorption potential of the extraction by-product. The effect of alkali pre-treatment (duration and NaOH concentration) and extraction time were separately investigated and optimized in terms of agar yield, gel strength, gelification and melting temperatures and sulphate and 3,6-anidrogallactose contents. Alkali pre-treatment was carried out at 0.5, 1.5, 2.5 and 3.5 h and at NaOH concentrations of 0, 2, 4, 6 and 8%, in a full factorial design. The highest yield and gel strength were obtained at 3.5 h duration and 6% NaOH, then the succeeding extraction optimization was done employing these pre-treatment conditions. Extractions were carried out at 1.5, 2, 2.5 and 3 h and best agar quality was obtained for a 2-hour extraction time. Therefore, the optimum conditions for agar extraction from the alga are 3.5 h pre-treatment duration, 6% NaOH concentration and 2 h extraction time. Films from agar extracted using the optimum conditions were made using the knife coating technique. The physical properties of films such as hygroscopicity, mechanical resistance (Young's modulus, tensile strength and elongation), and permeability to water vapour and oxygen were characterized. The agar films were transparent and optically clear, showing good properties similar to the commercial agar films. Biosorption of lead ions to the waste in the optimized agar extraction process at fixed temperature and pH was also studied and compared with results obtained by other authors using similar waste or algae. Equilibrium data were adjusted to equilibrium models. The good uptake capacity of the extraction waste shows that biosorption of heavy metals also constitutes a promising application for *Gracilaria vermiculophylla*. Considering the abundance of raw material achieved at low cost and the properties of the agar obtained commercial use of *G.vermiculophylla* from Ria de Aveiro is well justified.

Keywords: *Gracilaria vermiculophylla*, agar, gels, biodegradable films, biosorption

Notação e Glossário

a_w	actividade de água	adimensional
c.d.o.	comprimento de onda	(nm)
C	constante de Guggenheim	adimensional
C_{eq}	concentração de metal na solução em equilíbrio	(mg/L)
D	coeficiente de difusividade	(m ² /s)
E	módulo de Young	(Pa)
G'	módulo de conservação ou elástico	(Pa)
G''	módulo de dissipação ou viscoso	(Pa)
G^*	módulo complexo dinâmico	(Pa)
H.R.	humidade relativa	(%)
J	fluxo que atravessa o filme por difusão por unidade de área	(g/m ² .s)
k	factor correspondente às propriedades das multicamadas relativamente ao volume de líquido	adimensional
$k_{1,ads}$	constante de biossorção do modelo de pseudo-primeira ordem	(min ⁻¹)
$k_{2,ads}$	constante de biossorção do modelo de pseudo-segunda ordem.....	(min ⁻¹ g biossorvente mg ⁻¹ metal)
K_L	coeficiente relacionado com a afinidade entre o biossorvente e os iões metálicos.....	(L mg ⁻¹)
OP	permeabilidade ao oxigénio	(ml m /m ² .s.Pa)
OTR	taxa de transmissão do oxigénio através do filme ao longo do tempo	(cm ³ /s)
P	permeabilidade	((ml ou g).m/m ² .s.Pa)
Ps	pressão de saturação	(Pa)
q_{eq}	quantidade de metal adsorvido no biossorvente em equilíbrio	(mg/L)

$q_{\max}$	quantidade máxima de metal por unidade de massa de bioissorvente necessária para formar uma monocamada na superfície (mg metal g ⁻¹ bioissorvente)
q_t	concentração de espécies iónicas no bioissorvente no instante t (mg metal g ⁻¹ bioissorvente)
Q	quantidade de gás ou vapor que atravessa o filme (ml ou g)
$r_{\text{ads}}(i)$	velocidade inicial de adsorção (min ⁻¹ mg metal g ⁻¹ bioissorvente)
S	constante de solubilidade de Henry (mole/atm)
t	tempo (s)
TE	tempo de extracção (h)
T_g	temperatura de gelificação (°C)
T_f	temperatura de fusão (°C)
X_0	teor de humidade correspondente à saturação da monocamada (g H ₂ O/g sólido seco)
X_e	teor de humidade de equilíbrio à actividade de água a_w (g H ₂ O/g sólido seco)
$WVTR$	taxa de transmissão de vapor de água através do filme ao longo do tempo (g/s)

Letras Gregas

δ	desfasamento (ângulo de perda ou dissipação) (rad)
Δp	diferença de pressões parciais (Pa)
ΔT	histerese térmica (°C)
γ	deformação adimensional
γ_a	amplitude de deformação adimensional
γ^*	deformação complexa adimensional
σ	tensão de corte (Pa)
σ_a	amplitude da tensão de corte (Pa)
σ^*	tensão complexa (Pa)
ω	frequência de oscilação (rad/s)

Listas de Siglas

3,6-AG	3,6- anidrogalactose
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier
PT	Pré-tratamento
EAA	Espectrofotometria de absorção atômica

Espécies de algas

<i>G. vermiculophylla</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>
<i>G. edulis</i>	<i>Gracilaria edulis</i>
<i>G. crassa</i>	<i>Gracilaria crassa</i>
<i>G. foliifera</i>	<i>Gracilaria foliifera</i>
<i>G. corticata</i>	<i>Gracilaria corticata</i>

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Notação e Glossário	vii
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tabelas	xvi

1. Introdução	1
1.1. Introdução geral	1
1.2. Objectivos do trabalho	1
1.3. Estrutura da tese	2
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Resíduo das embalagens plásticas – um problema da sociedade contemporânea	3
2.2. Polímeros biodegradáveis – a alternativa do futuro	3
2.3. Produção de agar em Portugal – potencialidades por explorar	4
2.4. Algas vermelhas – <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	5
2.5. Agar	6
2.5.1. Estrutura química	6
2.5.2. Solubilidade	6
2.5.3. Viscosidade	6
2.5.4. Gelificação	7
2.5.5. Processo de extracção: <i>Gracilaria</i> vs. <i>Gelidium</i>	8
2.6. Caracterização dos géis	8
2.6.1. Propriedades mecânicas	9
2.6.2. Propriedades reológicas	9
2.7. Caracterização dos filmes	11
2.7.1. Propriedades mecânicas	11

2.7.2. Propriedades de barreira	11
2.7.2.1. Sorção de humidade	12
2.7.2.2. Permeabilidade	12
2.8. Aplicações na Indústria Alimentar	15
2.9. Biossorção de metais pesados	16
2.9.1. Cinética	16
2.9.2. Modelo de equilíbrio	17
3. Extracção e Caracterização do agar da <i>G.vermiculophylla</i>	18
3.1. Materiais	18
3.2. Métodos experimentais	18
3.2.1. Extracção do agar	18
3.2.1.1. Delineamento experimental do processo de extracção	18
3.2.1.2. Procedimento experimental	19
3.2.2. Caracterização das amostras de agar	20
3.2.2.1. Determinação do teor em sulfato	20
3.2.2.2. Determinação do teor em 3,6-anidrogactose	21
3.2.3. Ensaio reológico	21
3.2.3.1. Reómetro utilizado	21
3.2.3.2. Preparação dos géis	21
3.2.3.3. Procedimento experimental	21
3.2.4. Ensaio de análise de textura	22
3.2.4.1. Texturómetro utilizado	22
3.2.4.2. Preparação dos géis	22
3.2.4.3. Procedimento experimental	23
3.3. Resultados e Discussão	23
3.3.1. Rendimento	23
3.3.2. Propriedades mecânicas do gel	25
3.3.3. Análises reológicas	26
3.3.4. Teores em sulfato e em 3,6-anidrogactose	28
3.4. Parâmetros óptimos	30

3.5. Conclusões	30
 4. Produção e caracterização dos filmes obtidos a partir do produto otimizado	 32
4.1. Materiais	32
4.2. Métodos experimentais	32
4.2.1. Produção dos filmes	32
4.2.1.1. Preparação das soluções	32
4.2.1.2. Preparação dos filmes pela técnica “knife coating”	32
4.2.2. Caracterização dos filmes	33
4.2.2.1. Medição da espessura	33
4.2.2.2. Propriedades higroscópicas. Isotérmicas de sorção	33
4.2.2.3. Permeabilidade ao vapor de água (WVP)	33
4.2.2.4. Permeabilidade ao oxigênio (OP)	34
4.2.2.5. Propriedades mecânicas	34
4.3. Resultados e Discussão	35
4.3.1. Propriedades higroscópicas. Isoérmicas de sorção	35
4.3.2. Permeabilidade ao vapor de água (WVP)	37
4.3.3. Permeabilidade ao oxigênio (OP)	37
4.3.4. Propriedades mecânicas	38
4.4. Conclusões	40
 5. Biossorção de metais pesados	 41
5.1. Materiais	41
5.2. Métodos experimentais	41
5.2.1. Preparação dos bio sorventes	41
5.2.2. Preparação das soluções	41
5.2.3. Estudos cinéticos	41
5.2.4. Estudos de equilíbrio	42
5.2.5. Procedimento analítico	42
5.3. Resultados e Discussão	43

5.3.1. Estudos cinéticos	43
5.3.2. Estudos de equilíbrio	44
5.4. Conclusões	45
6. Conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros	46
7. Bibliografia	48

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo da organização da tese.	1
Figura 2 – <i>Gracilaria vermiculophylla</i> .	6
Figura 3 – Estrutura química do agar (agarose+agarpectina).	6
Figura 4 – Esquema representativo das etapas da extracção do agar da <i>Gracilaria</i> .	8
Figura 5 – Exemplo da resposta de um gel (tensão em função da deformação) num teste de penetração.	9
Figura 6 – Trituração (A); Pano usado para filtrar (B); Filtração (C).	20
Figura 7 – Agar.	20
Figura 8 – Reómetro CARRI-MED CSL.	21
Figura 9 – Texturómetro TAXT2.	22
Figura 10 – Rendimentos médios e respectivos erros obtidos na optimização da etapa do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.	23
Figura 11 – Rendimentos médios e respectivos erros obtidos na optimização da etapa da extracção para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.	24
Figura 12 – Forças dos géis médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.	25
Figura 13 – Forças dos géis médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa de extracção para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.	26
Figura 14 – Tg médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.	27
Figura 15 – Tf médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa do PT para as diferentes concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.	27
Figura 16 - Tf médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa de extracção, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.	28
Figura 17 - Tg médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa de extracção, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.	28
Figura 18– Teores em sulfato médios e respectivos erros obtidos na optimização do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.	28
Figura 19– Teores em 3,6-AG médios e respectivos erros obtidos na optimização do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.	28
Figura 20- Teores em sulfato médios e respectivos erros obtidos na optimização da etapa de extracção, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.	29
Figura 21- Teores em 3,6-AG médios e respectivos erros obtidos na optimização da etapa de extracção, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.	29
Figura 22 – Técnica “knife coating”.	32

Figura 23 – Testes de tracção.	35
Figura 24 - Massa de água adsorvida por massa seca de filme em função da a_w e respectivo ajuste pelo modelo de GAB, para os filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e agar comercial.	35
Figura 25 – Taxa de transmissão do vapor de água através dos filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e agar comercial e respectivo erro.	37
Figura 26- Permeabilidade ao vapor de água e respectivo erro para os filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e agar comercial.	37
Figura 27- Taxa de transmissão de O_2 através dos filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e agar comercial e respectivo erro.	38
Figura 28- Permeabilidade ao O_2 e respectivo erro para os filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e agar comercial.	38
Figura 29 – Módulo de Young e respectivo erro para os filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e agar comercial.	39
Figura 30 - Deformação na ruptura e respectivo erro para os filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e agar comercial.	39
Figura 31 - Tensão na ruptura e respectivo erro para os filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e agar comercial.	39
Figura 32- Quantidade de metal adsorvida pelo resíduo em função do tempo. Ajuste dos dados experimentais pelos modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.	43
Figura 33- Isotérmica de bioissorção de (PbII) do resíduo da <i>G.vermiculophylla</i> - Modelo de Langmuir.	44

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Aplicações típicas do agar na indústria alimentar (Empresa AgarGel, 2003).	15
Tabela 2 – Parâmetros para a Optimização do processo de extracção.	18
Tabela 3 – Forças dos géis obtidas por Meena et al. (2007) para as espécies <i>G.edulis</i> , <i>G.crassa</i> , <i>G.foliifera</i> e <i>G. corticata</i> . (Temp. do PT de 90°C e duração de 2h; Temp. da extracção de 120°C e duração de 1,5h).	26
Tabela 4 - Actividades da água das soluções saturadas de sais a 25°C (referências Labuza, 2002; Larotonda, 2007).	33
Tabela 5 - Parâmetros C, k, X_0 e R^2 para os filmes de agar optimizado e agar comercial (presente estudo) e para os filmes de “Sargaço”, alginato e κ -carragenina (Sousa & Martins, 2007).	36
Tabela 6 – Permeabilidade ao vapor de água para alguns biopolímeros e polímeros sintéticos.	37
Tabela 7 – Permeabilidade ao oxigénio para os filmes em estudo e para alguns polímeros sintéticos. (fonte: Larotonda, 2007).	38
Tabela 8 - Resumo dos resultados referentes aos testes mecânicos de tracção para os filmes de agar da <i>Gracilaria</i> e de agar comercial; comparação com outros biopolímeros (Sousa & Martins, 2007).	39
Tabela 9- Parâmetros dos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem para o resíduo estudado.	44
Tabela 10- Parâmetros estimados para o modelo de Langmuir e respectivos erros.	44
Tabela 11- Capacidades de retenção máxima para outras algas e resíduos já estudados.	45

1. Introdução

1.1. Introdução Geral

Os plásticos sintéticos são extensivamente usados como materiais de embalagem de alimentos devido às suas características funcionais e existência em grandes quantidades e a baixo custo. No entanto, a sua não biodegradabilidade conduz a problemas ecológicos. Com uma sociedade cada vez mais preocupada com as questões de cariz ambiental, a diminuição da dependência deste tipo de materiais revela-se de extrema importância.

Uma alternativa emergente face a este problema é o recurso a polímeros naturais tais como, polissacarídeos, proteínas e lípidos, na fabricação de embalagens de alimentos. Os estudos feitos a estes biofilmes ganham cada vez mais relevância e as suas características atractivas colocam-nos numa posição privilegiada como a alternativa de futuro face aos polímeros sintéticos.

O agar é um exemplo de um polímero natural que pode ser extraído das macroalgas vermelhas e cujo grande poder espessante e gelificante levam-no a ser amplamente utilizado no mundo industrial. Apesar das inúmeras aplicações que lhe são atribuídas como gel, a verdade é que são muito poucos os estudos realizados sobre a sua aplicação à produção de filmes biodegradáveis.

Com este projecto pretendeu-se estudar a qualidade do agar extraído a partir das algas da espécie *Gracilaria vermiculophylla* proveniente da Ria de Aveiro, e o seu potencial uso como agente gelificante e na fabricação de filmes biodegradáveis para embalagem de alimentos. Outra aplicação estudada foi a biossorção de metais pesados pelo resíduo da alga resultante do processo de extracção do agar.

1.2. Objectivos do trabalho

Este projecto teve como objectivo principal a caracterização do agar proveniente da extracção da alga vermelha *G.vermiculophylla*, e o estudo das suas possíveis aplicações. No fundo, com o desenvolvimento deste projecto pretendeu-se:

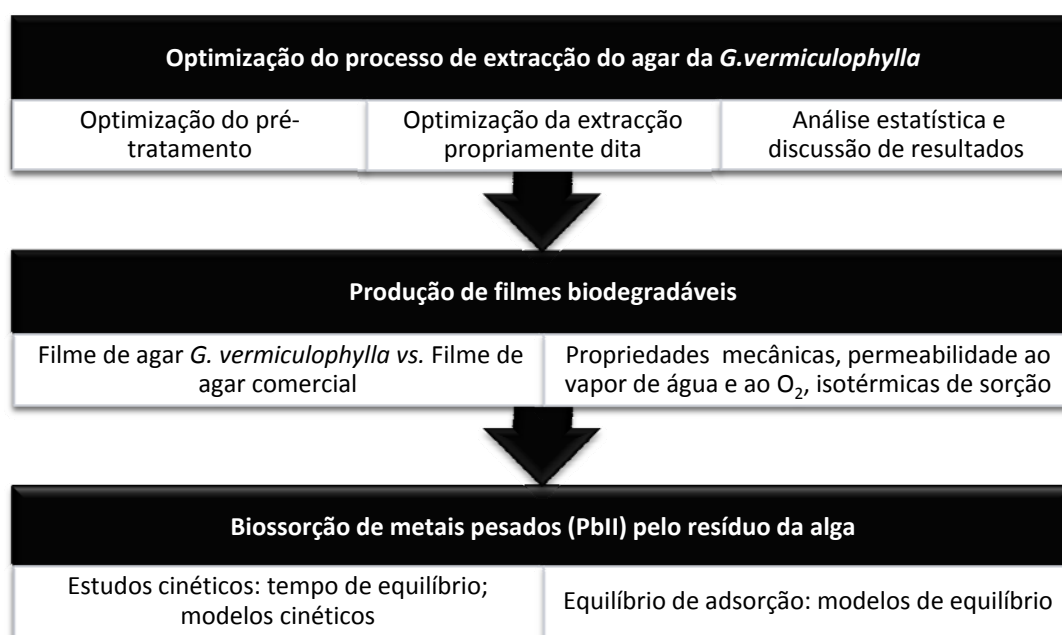
- Caracterizar o agar extraído da *G.vermiculophylla* provando a sua qualidade como agente gelificante e espessante. Determinar qual os parâmetros que nos conduzem à extracção óptima;

- Aplicar o agar otimizado à produção de filmes biodegradáveis e atestar a qualidade dos filmes produzidos para embalagem de alimentos;
- Comprovar a capacidade de biossorção de metais pesados, mais concretamente chumbo, pelo resíduo resultante da extracção;
- Valorizar o recurso a matérias-primas renováveis como é o caso da *G.vermiculophylla* existente em grandes quantidades na Ria de Aveiro;
- Demonstrar o abrangente leque de aplicações que o agar pode apresentar, e que o colocam numa posição privilegiada face ao mundo industrial.

1.3. Estrutura da tese

Na Figura 1 faz-se uma exposição esquemática do trabalho que irá ser apresentado.

Figura 1 – Esquema representativo da organização da tese.



2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será feita a contextualização da temática do projecto desenvolvido e serão apresentados conceitos fundamentais para a compreensão do mesmo, bem como, será realizada uma breve exposição das propriedades dos géis e filmes em avaliação.

2.1. Resíduos das embalagens plásticas – um problema da sociedade contemporânea

Os plásticos são amplamente utilizados por todo o mundo e a sua produção anual aumenta em média 10% ao ano. Na Europa Ocidental as embalagens representam a maior fatia (27%) das aplicações finais dos plásticos. Os resíduos gerados pelas embalagens plásticas têm um grande impacto no lixo doméstico produzido, e em Portugal, chegam a atingir 25% do total dos resíduos gerados por embalagens (Larotonda, 2007). A preocupação crescente dos consumidores relativamente às questões ambientais estimula a procura de recursos biodegradáveis que possam diminuir a dependência relativamente às embalagens sintéticas. Este tipo de embalagens feitas à base de produtos petroquímicos, tais como, poliolefinas, poliésteres, poliamidas, etc., têm sido amplamente utilizadas pois existem em grandes quantidades e a baixo custo e possuem características atractivas, como uma boa força de tracção, boas propriedades de barreira ao oxigénio e capacidade de reter o aroma (Larotonda, 2007). Pelo contrário, possuem baixa transmissão ao vapor de água, são tóxicas, poluentes e a sua degradação pode demorar centenas de anos. Estudos realizados comprovam que muitos destes compostos sintéticos estão também associados a uma gama alarmante de doenças. Com a crise petrolífera mundial a agravar-se encontrar uma solução alternativa que vise diminuir a dependência da sociedade deste tipo de compostos revela-se de importância vital.

2.2. Polímeros biodegradáveis – a alternativa do futuro

A acumulação dos resíduos provenientes de matérias-primas não renováveis constitui uma grave ameaça ambiental pelo que, a procura de alternativas “amigas do ambiente” levou ao desenvolvimento de diferentes plásticos produzidos a partir de biopolímeros (Freile-Pelegrín et. al, 2006). Plásticos com estruturas baseadas em polímeros naturais (lípidos, proteínas,

polissacarídeos) quando colocados em ambientes biologicamente activos, têm uma velocidade de degradação maior. A sua decomposição pode ser levada a cabo por ataques microbiológicos e/ou exposição a agentes atmosféricos tais como, radiação solar, vento, chuva, humidade, entre outros. A degradação química destes materiais também pode ocorrer devido à quebra de ligações moleculares, pois são estruturas de grande instabilidade. Todas estas características especiais possibilitam processos de reciclagem natural. Uma das desvantagens do uso destes biopolímeros é o seu “tempo de vida” que vai desde meses até alguns anos (3-4) pelo que muitos deles ainda não foram incorporados em produtos comercializados. Outro problema inerente a estes polímeros naturais é que não são tão resistentes como os polímeros sintéticos (D. Phan et al., 2005). Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos muitos estudos no sentido de descobrir biopolímeros capazes de substituir os polímeros sintéticos em aplicações a embalagens ou revestimentos na indústria alimentar e/ou farmacêutica. Na utilização como embalagens de alimentos, os filmes biodegradáveis devem aumentar a vida-de-prateleira do produto e obedecer a critérios de segurança, tais como, propriedades de barreira (vapor de água, gases, luz, aroma), propriedades ópticas (transparência), propriedades mecânicas (força, deformação), resistência a fenómenos químicos e à temperatura, e ainda, devem apresentar um preço competitivo (Haugaard et al., 2001).

As algas são fontes subaproveitadas de alguns biopolímeros que podem ser utilizados na produção destes biofilmes. As algas vermelhas, um tipo de macroalgas marinhas, são um recurso natural de obtenção de agar. O agar é um biopolímero com uma estrutura única e características singulares que o tornam num potencial candidato no que diz respeito a aplicações a embalagens de alimentos. É aprovado para uso na indústria alimentar figurando na lista GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e o seu grande poder gelificante a baixas concentrações constitui a sua principal arma comercial (Davidson, 1980).

2.3. Produção de agar em Portugal – potencialidades por explorar

Uma importante fonte de agar é o género de alga vermelha *Gracilaria*, existente em abundância em Portugal, mais concretamente na Ria de Aveiro. As empresas ibéricas de extracção de agar utilizam maioritariamente matéria-prima importada de países como, África, América do Sul e China. As vantagens do recurso à produção local de agar

proveniente das espécies do género *Gracilaria*, torna-se portanto, evidente: a proximidade da matéria-prima permite-nos uma produção em contínuo sem custos adicionais de importação das algas; o controlo das condições de cultura destas plantas marinhas (até certo ponto) que nos permite uma elevada homogeneidade na matéria-prima e consequentemente, no produto obtido; a existência de áreas disponíveis para o cultivo das algas, nomeadamente, nas salinas desactivadas de Aveiro e outras (Pereira et al., 2008).

2.4. Algas vermelhas - *Gracilaria vermiculophylla*

O agar é um biopolímero da classe dos poligalactanos que surge como um material intracelular em várias espécies de algas vermelhas (algas marinhas da divisão *Rhodophyta*). As algas produtoras de agar (agarófitas) encontram-se nas famílias *Gracilariaceae*, *Gelidiaceae*, *Phyllophoraceae* e *Ceramiceae* (Stephen 1995). A *Gracilaria* constitui um género de macroalga de coloração vermelha da família *Gracilariaceae*, de grande importância económica mundial devido à sua capacidade de produção de agar aliada à sua facilidade de reprodução e rápido crescimento (Jones et al., 1995). Este género é dos que abrange um maior número de espécies de algas dentro da divisão *Rhodophyta*, sendo a maioria proveniente de regiões tropicais de água quente (Feíle-Pelegrín & Murano, 2005). Grande parte da produção mundial de agar advém do género *Gracilaria* (53%) e *Gelidium* (44%) e apenas uma pequena quantidade (3%) é produzida a partir de agarófitas como a *Gelidiella* e *Pterocladia* (Marinho-Soriano & Burret, 2003). Apesar das espécies do género *Gracilaria* produzirem géis tipicamente mais fracos quando comparados com as do género *Gelidium*, são consideradas as mais importantes fontes de agar a nível mundial, pois a sua cultura é mais fácil: é uma alga que cresce rapidamente e é mais barata sendo por isso amplamente utilizada. O facto de não produzirem géis de grande qualidade é facilmente contornável com a introdução de um pré-tratamento alcalino no processo de extracção que vai garantir a qualidade do produto obtido. Por outro lado, os géis fracos obtidos a partir do agar extraído destas algas com o seu baixo índice de sinerese (devido ao teor altamente sulfatado), podem ser muito úteis como agentes gelificantes na produção de alimentos de textura caracteristicamente macia, tais como, geleias e compotas (Freile-Pelegrín & Murano, 2005). Em Portugal, as algas do género *Gracilaria* constituem um recurso natural da Ria de

Aveiro, onde populações destas algas existem o ano inteiro em grandes quantidades (Santos & Duarte, 1991).

A espécie *Gracilaria vermiculophylla*, Figura 2, atinge comprimentos entre os 15 e os 100 cm, e ramificações com diâmetros na gama, 2-5 mm. É muito ramificada e a sua coloração pode variar desde o castanho a um vermelho tinto acinzentado, dependendo da luz solar a que está exposta.



Figura 2 – *Gracilaria vermiculophylla*.

2.5. Agar

2.5.1. Estrutura química

O agar é um polissacarídeo composto maioritariamente por dois componentes, agarose e agarpectina, Figura 3. A agarose é um polissacarídeo neutro com uma estrutura linear de unidades repetitivas do dissacarídeo agarobiose (dímero constituído de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose). A agarpectina é um polissacarídeo sulfatado, composto por agarose com grupos éster sulfatos, ácido pirúvico e ácido D-glucurónico (Arvizu-Higuera et al., 2007). A origem do agar e o modo como é extraído são factores determinantes no tipo de mistura de polissacarídeos que podemos obter.

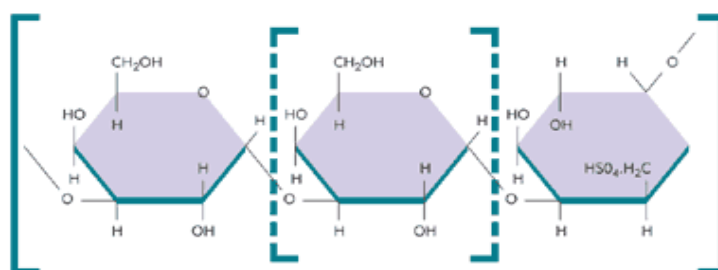


Figura 3 – Estrutura química do agar (agarose+agarpectina).

2.5.2. Solubilidade

O agar é insolúvel em água fria mas facilmente solúvel em água quente (95 – 100°C). Por arrefecimento da solução, forma-se um gel. Uma vez formado o gel, é necessário um reaquecimento até temperatura mais elevada para se dar a sua fusão. Este fenómeno designa-se por histerese térmica e é útil em muitas aplicações (Davidson, 1980; Stephen, 1995).

2.5.3. Viscosidade

A viscosidade da solução depende da espécie de algas de onde é proveniente o agar e das condições da extração. Como muitos outros polímeros lineares, a sua viscosidade aumenta exponencialmente com a concentração. O agar apresenta viscosidades mais baixas que a carragenina (outro biopolímero extraído das algas vermelhas) devido à menor quantidade de grupos carregados presentes na cadeia polimérica. Tais características resultam numa molécula menos hidrofílica com uma cadeia mais flexível e menos estendida que oferece menor resistência ao escoamento. A viscosidade de uma solução de agar aumenta ligeiramente à medida que a solução é arrefecida. Quando a transição sol-gel se aproxima este aumento torna-se mais acentuado e atinge o seu pico no momento da gelificação (Davidson, 1980; Stephen, 1995).

2.5.4. Gelificação

Por arrefecimento de soluções quentes formam-se géis termorreversíveis. A formação de hélices na solução constrói uma rede capaz de imobilizar a água – formação do gel. A temperaturas acima do ponto de gelificação da solução, a agitação térmica sobrepõe-se à tendência do polímero de agar a formar hélices, e este existe em solução como um novelo. As transições de sol-gel dos agares exibem tipicamente histerese térmica, isto é, a temperatura de fusão é superior à temperatura de gelificação (cerca de 40-50°C de diferença). Este fenómeno é função da densidade de carga sendo mais acentuado nos agares, e menos noutros polissacarídeos semelhantes tais como, as carrageninas kappa- (κ -) e iota- (ι -), que possuem maior teor em sulfatos. Muitas das aplicações do agar dependem da sua elevada histerese. Os géis de agar são fortes, no entanto estão sujeitos a sinerese, ou seja, separação da água do gel devido à agregação das hélices que resulta na contracção da rede polimérica e na diminuição dos espaços intersticiais que retêm a água. As moléculas de água são desta forma “obrigadas” a ir para a superfície do gel sendo possível observar uma película sobrenadante na superfície do mesmo. A sinerese é menos evidente nos géis de agar mais fracos cujo elevado teor em sulfatos lhes confere propriedades hidrofílicas. Agares de diferentes espécies de algas possuem marcadamente diferentes temperaturas de gelificação (variáveis entre 32 e 43°C), apresentando valores semelhantes dentro de uma mesma espécie (Stephen, 1995; Davidson, 1980).

2.5.5. Processo de extracção: *Gracilaria* vs. *Gelidium*

O agar é recuperado das algas por extracção com água a temperaturas acima do ponto de fusão dos seus géis (~ 85°C). O processo extractivo pode ser realizado em condições ácidas, neutras ou básicas, dependendo do tipo de alga e/ou da qualidade final que se pretende para o produto. No caso da *Gracilaria*, um género de algas tipicamente com elevado teor em sulfatos, é necessário efectuar um pré-tratamento (PT) em meio alcalino, antes da extracção. Este tratamento é feito com o intuito de eliminar grupos sulfatados e aumentar o conteúdo em 3,6-anidrogactose. Estas modificações químicas na estrutura do agar melhoram as propriedades gelificantes do produto final e aumentam o seu valor comercial, (Chirapart et al., 1995). Por outro lado, a extracção ácida melhora o rendimento de agar, pelo que pode ser usada uma combinação de um PT alcalino com uma extracção em meio ácido. O biopolímero agar é recuperado do extracto por um processo de congelamento-descongelamento, isto é, o extracto obtido é congelado, e posteriormente, deixado a descongelar à temperatura ambiente de forma a separar-se o agar da água e sais dissolvidos. O biopolímero obtido é então seco na estufa. Genericamente o processo de extracção do agar da *Gracilaria* pode ser esquematizado da seguinte forma, Figura 4.



Figura 4 – Esquema representativo das etapas da extracção do agar da *Gracilaria*.

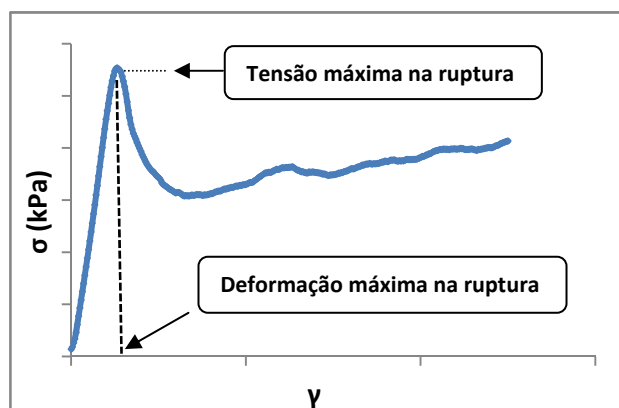
O agar extraído das algas *Gelidium* é sempre de grande qualidade pelo que não necessita de pré-tratamento alcalino.

2.6. Caracterização dos géis

2.6.1. Propriedades mecânicas

A força do gel pode ser definida como a força máxima que o gel apresenta na ruptura, ou seja, o valor maior da força que o gel consegue aguentar sem romper. Normalmente vem representada em g/cm^2 . Pode ser determinada recorrendo ao uso de um texturómetro

através de testes de penetração. Neste tipo de análises, o gel vai ser deformado pela introdução de uma sonda na sua matriz, ou seja, é-lhe aplicada uma força e é medida a sua resistência à penetração. Na Figura 5, é apresentado um exemplo de resposta de um gel em termos de tensão, quando lhe é aplicada uma força através de um teste de penetração. Para achar a força correspondente à tensão (σ) máxima na ruptura, basta multiplicá-la pela área da secção através da qual é exercida a tensão (área da sonda).



A resposta de um material à penetração pode ser afectada pela densidade e uniformidade da matriz, já que somente uma região da secção transversal é submetida à penetração e a resistência a essa força, mede o grau de compactação ou densidade, chamado firmeza (Barreto &

Figura 5 – Exemplo da resposta de um gel (tensão em função da deformação) num teste de penetração. (Beirão, 1999).

2.6.2. Propriedades reológicas

A caracterização das propriedades reológicas dos géis é geralmente realizada recorrendo a ensaios em regime dinâmico (testes oscilatórios) em que a amostra é testada de uma forma não destrutiva. Neste tipo de ensaios, é aplicada à amostra em estudo uma tensão (ou deformação), que é uma função sinusoidal do tempo e regista-se a deformação (ou tensão) resultante (Alves, 2001). Por exemplo, se for aplicada uma pequena deformação (γ) sinusoidal ao material, de acordo com,

$$\gamma = \gamma_a \cos \omega t \quad (2.1)$$

e se o material registar um comportamento linear, ou seja, a razão entre a deformação e a tensão for independente da amplitude da deformação aplicada, na gama de frequências utilizada, a tensão de corte resultante será também uma função sinusoidal do tempo, com a mesma frequência mas com um desfasamento δ (ângulo de perda ou dissipação),

$$\sigma = \sigma_a \cos(\omega t + \delta) \quad (2.2)$$

onde γ_a e σ_a são, respectivamente, as amplitudes máximas de deformação e tensão, ω a frequência e t o tempo. O ângulo de perda ou dissipação varia entre 0 e $\frac{\pi}{2}$, consoante o comportamento viscoelástico se aproxima mais de um sólido ou de um líquido. Para um sólido elástico linear $\delta = 0$ e para um fluido puramente viscoso, $\delta = \frac{\pi}{2}$.

Pela representação vectorial é possível apresentar a deformação e a tensão de corte sob a forma de números complexos,

$$\gamma^* = \gamma_a(\cos[\omega t] + i \sin[\omega t]) \quad (2.3)$$

$$\sigma^* = \sigma_a(\cos[\omega t + \delta] + i \sin[\omega t + \delta]) \quad (2.4)$$

donde se deduz o módulo complexo dinâmico (G^*), que contem a informação completa das propriedades viscoelásticas do material,

$$G^* = \sigma^* / \gamma^* = G' + iG'' = \sigma_a / \gamma_a (\cos \delta + i \sin \delta) \quad (2.5)$$

onde G' é o módulo de conservação (parte real do módulo complexo) e G'' é o módulo de dissipação (parte imaginária do módulo complexo), ou seja,

$$G' = (\sigma_a / \gamma_a) \cos \delta \quad (2.6)$$

$$G'' = (\sigma_a / \gamma_a) \sin \delta \quad (2.7)$$

G' representa a resposta elástica do sistema e G'' a resposta viscosa. Das equações (2.6) e (2.7) é possível concluir que,

$$\tan \delta = G'' / G' \quad (2.8)$$

Os módulos de conservação e dissipação definidos são grandezas físicas objectivas utilizadas na interpretação dos processos de gelificação e cura do gel em estudo (Torres, 2005).

2.7. Caracterização dos filmes

Os alimentos são sistemas dinâmicos com uma vida-de-prateleira limitada pelo que a principal função das embalagens é garantir a sua protecção, mantendo a qualidade sensorial do alimento. Para os filmes biodegradáveis se afirmarem, as suas características (ópticas, mecânicas, de barreira...) devem ir de encontro às verificadas para os filmes sintéticos. As

bioembalagens devem ainda, respeitar a legislação referente aos alimentos e embalagens garantindo a segurança e qualidade dos produtos. O desafio consiste em conciliar a durabilidade do filme biodegradável com o tempo de vida-de-prateleira do alimento (Haugaard et al., 2001).

2.7.1. Propriedades mecânicas

O estudo das propriedades mecânicas dos filmes biopoliméricos revela-se de extrema importância quando queremos garantir a sua integridade durante o processamento, manuseamento e armazenamento. As propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis dependem do tipo de material que forma o filme e especialmente da sua coesão estrutural, isto é, a capacidade que o polímero tem em formar fortes e numerosas ligações entre as cadeias poliméricas (Larotonda, 2007). Para avaliar as características mecânicas dos filmes são, normalmente, realizados testes de tracção no texturómetro (Cuq et al., 1996). As propriedades avaliadas neste tipo de testes são a tensão e a deformação na ruptura e ainda, o módulo de Young (E). A tensão na ruptura é a máxima força que um material consegue aguentar até à ruptura, à qual vai corresponder uma deformação também máxima que coincide com a alteração no comprimento que o filme aguenta até se romper. O módulo de Young ou módulo de elasticidade, é uma medição fundamental para se quantificar a rigidez inerente a um determinado material e é definido como a razão entre a tensão e a deformação na parte inicial linear da curva *tensão vs. deformação*. O procedimento é análogo ao realizado para a avaliação da textura dos géis (*ver parágrafo 2.6.1*) mas com o dispositivo adequado aos testes de tracção.

2.7.2. Propriedades de barreira

A deterioração das qualidades sensoriais, redução do conteúdo nutricional e a diminuição da qualidade dos alimentos durante o seu armazenamento, são causadas essencialmente por alterações físicas (amolecimento/endurecimento, perda ou retenção de água...), químicas (reações enzimáticas, hidrólise de lípidos e proteínas...) e ataques microbianos. Para controlar estes fenómenos é portanto fundamental o conhecimento aprofundado das propriedades de barreira, neste caso, ao vapor de água, O_2 e humidade (Haugaard et al., 2001).

2.7.2.1. Sorção de humidade

Devido à sua natureza hidrofílica, os filmes de agar dependem fortemente das condições ambientais, tais como, humidade relativa e temperatura, e tendem a adsorver grandes quantidades de água quando em ambientes de grande humidade.

As propriedades higroscópicas estão relacionadas com a actividade da água (a_w) que é uma propriedade de equilíbrio deste composto a uma dada temperatura e humidade (Labuza, 2002). A tendência para um filme adsorver água pode ser caracterizada por isotérmicas de sorção. Existem diversos modelos matemáticos usados para descrever as isotérmicas de sorção de humidade em sistemas alimentares. O modelo de *Guggenheim-Anderson-de-Boer* (GAB) é o mais utilizado na área da tecnologia alimentar e o que produz resultados mais satisfatórios (Larotonda, 2007). Este, é traduzido pela seguinte equação,

$$X_e = \frac{C k X_0 a_w}{[(1 - k a_w)(1 - k a_w + C k a_w)]} \quad (2.9)$$

onde X_e é a composição de equilíbrio de humidade à actividade de água a_w em $g\ g^{-1}$ de amostra seca, C é a constante de Guggenheim, k é o factor correspondente às propriedades das multicamadas relativamente ao volume de líquido e X_0 é o teor de humidade correspondente à saturação da monocamada em $g\ g^{-1}$ de amostra seca, ou seja, representa o conteúdo de água no momento da saturação de todos os sítios primários de sorção por uma molécula de água.

2.7.2.2. Permeabilidade

A velocidade de transmissão de um gás ou vapor através do filme por unidade de área de transferência e por unidade de espessura, induzida por uma diferença de pressões, sob condições específicas de temperatura e humidade, designa-se por permeabilidade (Larotonda, 2007). A permeabilidade ao vapor de água e ao oxigénio está relacionada com interacções poliméricas nos filmes biodegradáveis e mecanismos de transferência de massa (difusão). A permeação ou fluxo de uma substância através de uma membrana pode ser descrita matematicamente pela 1ª Lei de Fick. O fluxo (J) é proporcional ao gradiente de concentrações e pode ser definido numa direcção, equação (2.10),

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2.10)$$

em que, J é o fluxo ou a quantidade de substância que atravessa o filme por difusão por unidade de área por unidade de tempo em $g/m^2.s$ ou $ml/m^2.s$, D é o coeficiente de difusividade em m^2/s , $\partial C/\partial x$ é o gradiente de concentração da substância que se está a difundir por unidade de espessura do filme em $g/m^3.m$ ou $ml/m^3.m$.

Admitindo que, i) a difusão se dá em estado estacionário e que ii) o gradiente através do filme é linear, a equação (2.10) virá,

$$J = D \frac{(C_2 - C_1)}{x} = \frac{Q}{A.t} \quad (2.11)$$

onde, Q é a quantidade de gás que atravessa o filme em g (no caso do vapor de água) ou ml (no caso do O_2), A é a área do filme em m^2 e t é o tempo em s .

Aplicando a Lei de Henry, a força directriz virá expressa em termos de diferenças de pressões parciais de gás, equação (2.12),

$$\frac{Q}{A.t} = D.S. \frac{(p_2 - p_1)}{x} = \frac{P.\Delta p}{x} \quad (2.12)$$

em que, S é a constante de solubilidade de Henry em $mole/atm$, Δp é a diferença de pressões parciais de gás através do filme em Pa e P é a permeabilidade em $(ml \text{ ou } g).m/m^2.s.Pa$. As permeabilidades ao vapor de água e O_2 podem então ser calculadas pela seguinte equação geral:

$$P = \frac{Q.x}{A.t.\Delta p} \quad (2.13)$$

Permeabilidade ao vapor de água (WVP)

O método de determinação da permeabilidade ao vapor de água mais comum é o “método da panela”. Este método gravimétrico consiste em selar um filme previamente equilibrado, numa panela parcialmente preenchida com água destilada ($a_w = 1$) ou um sal anidro ($a_w = 0$). A panela é posteriormente colocada num exsiccador a humidade e temperatura controladas, e pesada periodicamente. Este gradiente de humidades relativas (força directriz constante) permite-nos quantificar a quantidade de água que passa através do filme. Esta força directriz, constitui a pressão parcial do vapor de água e é dada pela seguinte relação,

$$\Delta p = P_s(a_{w2} - a_{w1}) \quad (2.14)$$

onde P_s é a pressão de vapor da água à temperatura do teste e $(a_{w2} - a_{w1})$ é o gradiente de actividades entre o interior da panela e o exsiccador. Atingido o estado estacionário, deverá verificar-se uma variação constante de massa em função do tempo e o declive representará a taxa de transmissão de vapor de água através do filme ao longo do tempo, $WVTR$, em g/s .

$$WVTR = \frac{\Delta m}{\Delta t} \quad (2.15)$$

Esta taxa é o equivalente ao Q/t descrito na equação (2.13). Assim, a permeabilidade ao vapor de água, WVP ($g\ m\ m^{-2}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$) pode ser obtida pela equação geral da permeabilidade (2.13) mas adaptada à situação de WVP ,

$$WVP = \frac{\Delta m\ x}{A\ \Delta t\ \Delta p} \quad (2.16)$$

em que $\Delta m/\Delta t$ é a taxa de transmissão do vapor de água ao longo do tempo em g/s , x é a espessura do filme em m , A é a área de exposição do filme ao vapor de água em m^2 e Δp é a diferença das pressões parciais de vapor de água que atravessa o filme em Pa .

Permeabilidade ao oxigénio (OP)

O O_2 é responsável por muitas reacções de degradação dos alimentos e por isso no momento da produção de embalagens muitas vezes se procura excluí-lo para proteger o alimento. Por outro lado, a permeabilidade ao O_2 e CO_2 é essencial para a respiração dos tecidos vivos, tais como, frutos e vegetais. Por isso, filmes com propriedades de barreira aos gases moderadas são os mais apropriados (Larotonda, 2007). O método de determinação da permeabilidade ao O_2 envolve o fluxo deste gás de um dos lados do filme e, do outro lado, um fluxo de hélio (He) para conduzir o O_2 transmitido ao medidor de gás. O filme é fixado a uma célula de difusão de volume e área aberta conhecidos, que é purgada com He, de forma a garantir que o O_2 presente no interior da célula, no instante inicial, é praticamente nulo. Posteriormente, as válvulas são fechadas e durante intervalos de tempo t são retiradas amostras e a percentagem de O_2 é medida através de um medidor de gás. A taxa de transmissão do O_2 (OTR) através do filme ao longo do tempo (cm^3/s), pode ser determinada pelo declive da zona linear da curva, *volume de O_2 vs. tempo*,

$$OTR = \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad (2.17)$$

Novamente, a OTR equivale ao Q/t descrito na equação (2.13). O valor relativo à permeabilidade do O_2 , OP ($ml\ m\ m^{-2}s^{-1}Pa^{-1}$) pode ser obtido pela equação geral da permeabilidade (2.13) agora adaptada à situação de OP ,

$$OP = \frac{OTR.x}{A.\Delta p} \quad (2.18)$$

onde x é a espessura do filme em m , A é a área exposta em m^2 e Δp é a diferença de pressões parciais de O_2 que atravessa o filme em Pa , neste caso, corresponde à diferença de pressões parciais do O_2 no ar atmosférico e na célula de difusão (aprox. 0% O_2).

2.8. Aplicações na Indústria Alimentar

Algumas das aplicações mais importantes dos géis de agar na indústria alimentar encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Aplicações típicas dos géis de agar na indústria alimentar (fonte: Empresa AgarGel, 2003)

Indústria	Aplicação
Panificação	Coberturas de bolos, recheio de tortas, massas de pão
Doces e Confeitaria	Gomas, geleias, gelatinas
Produtos cárneos	Patês, produtos enlatados de peixe, frango e carne
Produtos lácteos	Estabilizante para gelados; melhora a textura dos queijos
Bebidas	Agente floculante nos vinhos e cerveja; preparação de sumos de fruta

Relativamente à aplicação comercial de filmes biodegradáveis de agar não foi encontrada qualquer informação bibliográfica. Os estudos realizados até ao momento sobre esta temática incidem na caracterização de biofilmes de agar comercial com a incorporação de plastificantes (Phan et al., 2007) e de filmes de agar extraído da *Gelidium robustum* (Freile-Pelegrín et al., 2007), o que vem reforçar o carácter pioneiro do presente estudo.

2.9. Biossorção de metais pesados

Os metais pesados representam o maior resíduo industrial contaminante de solos, plantas e animais no ecossistema, causando graves efeitos tóxicos ao homem principalmente devido à sua ampla distribuição no ambiente, que tem sido intensificada pela industrialização. O

chumbo, Pb(II), é um exemplo destes compostos prejudiciais ao homem e está associado a indústrias como, a petrolífera, de tintas e corantes, cerâmica, tubulações, cabos e munições. As algas constituem um tipo de biomassa com inúmeras vantagens para a biofixação, mecanismo subjacente à capacidade destes organismos fixarem e retirarem metais pesados dos meios aquáticos. Estes organismos macroscópicos são facilmente divididos em partículas de biofixante e com apenas algumas algas podemos tratar grandes quantidades de efluente; necessitam de poucos requisitos nutricionais, e geralmente, não produzem substâncias tóxicas ao contrário de microrganismos, como as bactérias ou fungos (Quintelas, 2007). Os custos reduzidos inerentes a este processo fazem com que ele assuma grande importância perante pequenas e médias indústrias que funcionam com orçamentos apertados. O recurso ao resíduo das algas como biofixante representa uma alternativa ainda mais barata pois esta é uma matéria sem qualquer aplicação que resulta do processo extractivo.

2.9.1. Cinética

Os modelos cinéticos permitem estudar a influência de diferentes factores físico-químicos na cinética da biofixação, nomeadamente na constante cinética, quantidade adsorvida e velocidade inicial de biofixação (Vilar, 2006). Os dois modelos de sorção cinética usados neste estudo são baseados na equação de Ritchie: modelo de pseudo-primeira ordem ou modelo Lagergren (equação 2.19) e modelo de pseudo-segunda ordem (equação 2.20),

$$q_t = q_{eq} [1 - \exp(-k_{1,ads}t)] \quad (2.19)$$

$$q_t = \frac{q_{eq}^2 k_{2,ads} t}{1 + k_{2,ads} q_{eq} t} \quad (2.20)$$

onde q_t é a concentração de espécies iónicas no biofixante no instante t ($mg\ metal\ g^{-1}biofixante$); $k_{1,ads}$ é a constante de biofixação da equação de pseudo-primeira ordem (min)⁻¹ e $k_{2,ads}$ é a constante de biofixação do modelo de pseudo-segunda ordem ($min^{-1} g\ biofixante\ mg^{-1}metal$). O modelo de pseudo-primeira ordem assume que a biofixação de uma espécie metálica ocorre num único centro activo da superfície do biofixante e a superfície é homogénea, correspondendo a sítios iguais com igual afinidade para o ião metálico. Por outro lado, o modelo de pseudo-segunda ordem

assume que a espécie metálica se liga a dois centros activos da superfície homogénea do bioissorvente, considerando igualmente sítios com a mesma afinidade (Vilar, 2006).

A velocidade inicial de bioissorção ($r_{ads}(i)$ ($\text{min}^{-1} \text{mg metal g}^{-1} \text{bioissorvente}$)) permite comparar a cinética de um dado ião metálico num bioissorvente, e pode ser calculada por,

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{dq}{dt} = r_{ads}(i) \quad (2.21)$$

Logo, $r_{ads}(i) = k_{1,ads} q_{eq}$ e $r_{ads}(i) = k_{2,ads} q_{eq}^2$ para os modelos de pseudo-primeira-ordem e pseudo-segunda-ordem, respectivamente.

2.9.2. Modelo de equilíbrio

A compreensão do mecanismo de bioissorção é possível através do estudo das isotérmicas de equilíbrio de adsorção que nos permitem a obtenção de parâmetros descritivos das capacidades de fixação dos bioissorventes. O modelo de Langmuir assenta no pressuposto de existirem sítios livres onde ocorre a bioissorção do ião metálico e é representado pela seguinte equação:

$$q_{eq} = \frac{q_{max} K_L C_{eq}}{1 + K_L C_{eq}} \quad (2.22)$$

onde, $C_{eq}(\text{mg metal L}^{-1})$ e $q_{eq}(\text{mg metal g}^{-1} \text{bioissorvente})$ representam a concentração de metal na solução e a quantidade de metal adsorvido no bioissorvente no equilíbrio, respectivamente; $q_{max}(\text{mg g}^{-1})$ é a quantidade máxima de metal por unidade de massa de bioissorvente necessária para formar uma monocamada na superfície e $K_L(\text{L mg}^{-1})$ é o coeficiente relacionado com a afinidade entre o bioissorvente e os iões metálicos. Este modelo foi desenvolvido para adsorção em monocamada e assenta nos seguintes pressupostos: i) cada centro activo só pode acomodar uma espécie adsorvida; ii) as entidades adsorvidas estão ligadas à superfície em locais fixos; iii) a adsorção máxima corresponde à saturação da monocamada de moléculas de adsorvato na superfície do adsorvente; iv) a adsorção é energeticamente idêntica em todos os centros activos e independente da presença ou não de espécies adsorvidas na sua vizinhança (Vilar, 2006).

3. Extracção e Caracterização do agar da *Gracilaria vermiculophylla*

Neste capítulo será apresentado todo o trabalho referente à optimização do processo de extracção do agar da *G. vermiculophylla*.

3.1. Materiais

As amostras de algas da espécie *G. vermiculophylla* foram recolhidas na Ria de Aveiro, Portugal (40°38'2.5"N, 8°40'32.5") a 28 de Janeiro de 2008.

3.2. Métodos experimentais

3.2.1. Extracção do agar

3.2.1.1. Delineamento experimental do processo de extracção

O processo de extracção do agar foi avaliado em termos da influência do tempo e da concentração de NaOH no pré-tratamento (PT) e ainda do tempo de extracção (TE). Sabendo *a priori* que a interacção entre a optimização do PT e da extracção em si é praticamente nula, estas duas etapas foram optimizadas separadamente (Arvizu-Higuera et al., 2007). Desta forma, a optimização do PT alcalino foi delineada com base num método estatístico “full factorial design” do tipo 4², isto é, 4 níveis e 2 factores: tempo de PT (0,5; 1,5; 2,5 e 3,5h) e concentração de NaOH (0, 2,4 e 6%). Os tempos estudados na optimização da extracção propriamente dita foram 1,5, 2, 2,5 e 3h, Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros para a Optimização do processo de extracção.

<i>factor</i> nível	1	2	3	4	Referência
PT (h)	0,5	1,5	2,5	3,5	2
[NaOH] (%)	0	2	4	6	4
TE (h)	1,5	2	2,5	3	2,25

O processo foi optimizado em termos do rendimento, força do gel, teor em sulfato e em 3,6-anidrogactose, temperatura de gelificação, T_g, e temperatura de fusão, T_f, do gel. Na etapa de optimização do PT foram estudadas todas as possibilidades de conjugação entre níveis e factores para um tempo de extracção fixo de 2h, tendo-se constatado que o rendimento e a força do gel (variáveis com maior peso) aumentavam proporcionalmente com a concentração de NaOH, sendo os maiores valores registados para uma concentração igual a

6% (concentração limite em estudo). Também a análise estatística realizada aos resultados obtidos foi elucidativa quanto à maior influência da concentração do NaOH nas variáveis em estudo. Desta forma, e com o intuito de termos a certeza que 6% era de facto, a nossa concentração óptima, procedeu-se a uma série de extracções adicionais, entrando com uma concentração de 8%. Foi ainda realizada uma extracção em triplicado referente ao zero, cujos parâmetros são os valores intermédios dos extremos mínimos e máximos em análise. Com os valores óptimos obtidos para o PT alcalino procedeu-se à optimização da extracção, para os tempos ainda não testados.

Ao todo, nesta primeira fase do projecto foi realizado um total de 72 extracções: as extracções numeradas do 1 ao 48 são relativas à optimização do PT; do 49 ao 60 à concentração de NaOH de 8%; do 61 ao 69 à optimização da extracção propriamente dita e do 70 ao 72 são referentes ao zero.

A análise estatística consistiu num teste ANOVA (2 factores para o PT e 1 factor para a extracção) para avaliar a interacção entre parâmetros e a sua influência nas variáveis dependentes em análise; um teste de Pearson para avaliar a relação linear entre as propriedades do agar e um teste de Duncan para estudar as diferenças entre extracções (*Anexo 2*). Todas as extracções e análises aos produtos obtidos foram realizadas em triplicado para garantir a reprodutibilidade das experiências.

3.2.1.2. Procedimento experimental

O procedimento experimental foi baseado no descrito por Villanueva et al. (1999). Após a colheita das algas, estas foram lavadas com água fresca de forma a eliminar possíveis detritos, nomeadamente, outras algas, moluscos invertebrados e crustáceos. Seguidamente, as algas foram secas na estufa a 60°C.

Foram colocadas 4g de algas em 200 ml de solução de NaOH com a concentração adequada (0, 2, 4, 6 e 8%) num forno a temperatura controlada (85°C) durante a duração do PT em avaliação (0,5; 1,5; 2,5 e 3,5h). Após o PT alcalino, procedeu-se à lavagem das algas com água até o seu aspecto deixar de ser “ensopado”.

Seguidamente, colocaram-se as algas lavadas em 200 ml de ácido acético 0,025% à temperatura ambiente durante uma hora. Para remover o excesso de ácido, lavaram-se novamente as algas com água da torneira. Colocaram-se as algas lavadas em 200 ml de água

destilada a 85°C durante o tempo pretendido (1,5, 2, 2,5 e 3h) dando início ao processo de extracção.

Posteriormente, trituraram-se as amostras (≈ 2 minutos) e procedeu-se à sua filtração com a ajuda de um pano, Figuras 6 (A) e (B). O extracto recuperado, Figura 6 (C), foi tratado por um processo de congelamento-descongelamento de forma a eliminar água e possíveis sais dissolvidos.

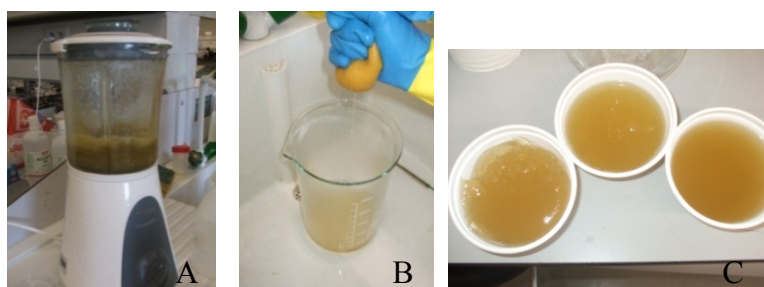


Figura 6 – Trituração (A); Filtração(B); Extracto (C).



Figura 7 – Agar.

Depois de congelado, o extracto foi descongelado à temperatura ambiente com a ajuda de uma ventoinha, desidratado com etanol (96%), e o agar foi recuperado, Figura 7. Finalmente, o produto obtido foi seco na estufa (60°C), durante 24 horas, e posteriormente pesado de forma a ser determinado o rendimento de cada extracção.

3.2.2. Caracterização das amostras de agar

3.2.2.1. Determinação do teor em sulfato

O teor em sulfato dos extractos foi determinado pela técnica de precipitação com cloreto de bário descrita por Jackson & MacCandless (1978), depois da hidrólise da amostra em HCl 1M a 100°C durante 4h. A determinação do teor em sulfato de bário fez-se por leitura da densidade óptica a um comprimento de onda 500 nm recorrendo a um espectrofotómetro de UV-visível (UNICAM, Software Heλios). A hidrólise permitiu a libertação dos sulfatos da amostra para a solução e a posterior adição de BaCl_2 , fez com que os iões bário se ligassem aos sulfatos por uma reacção de precipitação. Nesta fase do procedimento, foi ainda adicionado peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que actuou como agente descolorante tornando a solução incolor e permitindo a posterior análise da turbidez pelo espectrofotómetro. O BaCl_2 foi previamente colocado em agarose que funcionou como um agente de suspensão, mantendo o precipitado disperso na solução e permitindo a leitura da turbidez da amostra em análise.

3.2.2.2. Determinação do teor em 3,6 –anidrogalactose

A determinação do teor em 3,6-anidrogalactose foi feita pelo método colorimétrico com o reagente acetal-resorcinol (acetal dietílico de acetaldeído - benzeno-1,3-diol) descrito por Yaphe & Arsenault (1965). A análise colorimétrica foi realizada recorrendo ao espectrofotômetro UV-visível (UNICAM, Software Helios) por leitura da absorvância a um comprimento de onda de 555nm. A quantidade de 3,6-AG foi determinada recorrendo a uma curva de calibração de padrões de D-frutose.

3.2.3. Ensaios reológicos

3.2.3.1. Reómetro utilizado

As análises reológicas foram realizadas num reómetro de tensão controlada CARRI-MED CSL, Figura 8, equipado com uma geometria do tipo pratos paralelos, feita em acrílico, de superfície rugosa (40 mm de diâmetro). A opção por uma superfície deste tipo permitiu minimizar a influência da água nos testes, pois esta fica retida nos seus interstícios. A distância entre o prato inferior e o prato de acrílico foi de 2 mm. Antes do início da experiência, as amostras foram cobertas com uma camada de parafina líquida de forma a evitar a evaporação da água.



Figura 8 – Reómetro CARRI-MED CSL.

3.2.3.2. Preparação dos géis

Foram preparadas soluções de agar com concentração 1,5% em massa. Seguidamente levaram-se as misturas a solubilizar promovendo o seu aquecimento a agitação constante (mínimo 30 minutos). Após solubilização total, as soluções foram colocadas em copos de plástico (diâmetro 1cm, profundidade 2cm) deixando-se arrefecer até à temperatura ambiente. Durante o arrefecimento, verificou-se a formação do gel que foi deixado a repousar durante 20h para atingir o equilíbrio estrutural.

3.2.3.3. Procedimento experimental

O procedimento experimental realizado para os ensaios reológicos foi análogo ao descrito por Hilliou & Gonçalves (2007). Os géis de agar foram colocados na geometria tipo prato-

prato tendo sido promovido o seu aquecimento até 95°C. As soluções de agar quentes foram sujeitas aos seguintes ensaios:

- arrefecimento até 25°C a uma velocidade de 2,33°C/min enquanto deformações oscilatórias de amplitude reduzida (0,10%) foram aplicadas a uma frequência de 1 Hz, de forma a ser determinada a evolução com a temperatura das propriedades viscoelásticas lineares, tais como, $\tan \delta$, a tangente do ângulo de defasamento, δ , entre a deformação sinusoidal imposta e a tensão sinusoidal medida. A temperatura para a qual $\tan \delta = 1$ foi definida como a temperatura de formação do gel, T_g ;
- determinação das condições de equilíbrio por medição da evolução com o tempo, dos valores dos módulos de conservação, G' , e de dissipação, G'' , do gel, a 25°C;
- varrimento de frequência, a uma deformação de 0,1 %, de modo a obter um espectro mecânico do gel na região de viscoelasticidade linear, a 25°C;
- aquecimento do gel a uma velocidade de 2,33 °C/min até 95°C e medição dos G' e G'' para uma deformação de 0,1% e uma frequência de 1Hz, permitindo a caracterização da fusão do gel e a determinação da sua temperatura de fusão, T_f , definida como a temperatura para a qual $\tan \delta = 1$.

Para algumas amostras (1,5,6,7,8,9,10,12 e 14) a gama de temperatura do teste foi alargada, dos 20 até aos 95°C, pois verificou-se que aos 25°C ainda não tinham atingido a gelificação. As temperaturas de transição de fase obtidas para os géis encontram-se descritas na Tabela C1, *Anexo 1*.

3.2.4. Ensaios de análise de textura

3.2.4.1. Texturómetro utilizado

Para a medição da força do gel de cada extracto obtido foi utilizado um texturómetro TAXT2 (Stable Micro Systems Ltd.), Figura 9. A determinação deste parâmetro foi feita através de testes de penetração com a incorporação de uma sonda cilíndrica de diâmetro 10mm no aparelho de medição.



Figura 9 – Texturómetro TAXT2.

3.2.4.2. Preparação dos géis

Os géis utilizados para a análise da textura foram os mesmos que os preparados para os testes reológicos, *ver parágrafo 3.2.3.2 Preparação dos géis*.

3.2.4.3. Procedimento experimental

O procedimento experimental realizado foi análogo ao descrito por Hilliou et. al (2006). Os géis foram sujeitos a uma deformação de 50% (penetração de 1cm), a uma velocidade de penetração de 0,2 mm/s sendo registado no aparelho de aquisição de dados a força em função da distância. Após a aquisição dos dados, estes foram convertidos para o *Excel* e devidamente tratados de forma a serem calculadas a tensão máxima na ruptura (e correspondente deformação) e a força do gel. As forças dos géis obtidas para as diferentes amostras encontram-se dispostas em anexo, Tabela B1 *Anexo 1*.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Rendimento

Os rendimentos mais baixos, entre $(13,3 \pm 2,3)$ e $(17,5 \pm 1,9)\%$, foram registados para o agar sem PT alcalino (concentração de NaOH 0%), ao contrário do descrito por outros autores (Freíle-Pelegrín & Murano, 2004; Meena et al., 2007; Arvizu-Higuera et al., 2007), Figura 10. Estes resultados foram significativamente diferentes dos obtidos para outras concentrações (*Anexo 2*).

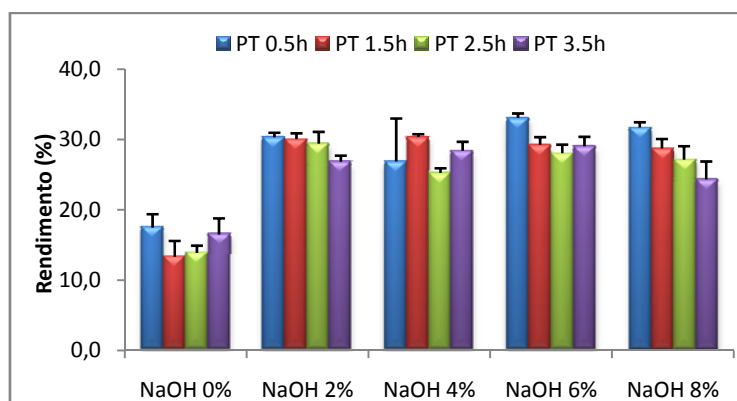


Figura 10- Rendimentos médios e respectivos erros obtidos na etapa de optimização do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.

Uma possível explicação para as diferenças verificadas é que no presente trabalho o agar sem PT alcalino foi colocado em água destilada a 85°C durante o tempo de PT apropriado, enquanto que, nos trabalhos citados o agar sem PT passou directamente para a etapa de extracção. Outra razão possível, é o facto do agar não sujeito a PT alcalino ser caracteristicamente fraco, pelo que durante o processo de congelamento-descongelamento, o produto não tenha formado uma matriz tão consistente e algum biopolímero se possa ter

perdido durante o processo de descongelamento. Verificam-se ainda diferenças no que diz respeito ao procedimento experimental usado nomeadamente, ao nível das temperaturas e duração das etapas do processo de extracção do agar.

Os rendimentos obtidos para concentrações do meio alcalino de 6 e 8% foram superiores, situando-se nas gamas, $(28,1 \pm 1,2)\%$ – $(33,1 \pm 0,6)\%$ e $(24,3 \pm 2,6)\%$ – $(31,7 \pm 0,7)\%$, respectivamente. O ligeiro decréscimo verificado quando foi aumentada a concentração de 6 para 8% poderá ter sido devido a uma possível degradação do polissacarídeo (Freile-Pelegrín & Robledo, 1997). Em oposição a estes resultados, Meena et al. (2007) reportaram que para as espécies *G. edulis*, *G. crassa*, *G. foliifera* e *G. corticata*, o rendimento diminuiu com o aumento da concentração de NaOH.

Arvizu-Higuera et al. (2007) relataram para a *G.vermiculophylla* um rendimento máximo bastante inferior (15,3%). Os mesmos autores registaram um rendimento superior para 0,5h de PT e uma diminuição da variável considerada com o aumento da duração do PT. Relativamente à alga estudada, registaram-se rendimentos significativamente diferentes para 0,5h de PT, não tendo, contudo sido verificada, uma relação inversamente proporcional entre o rendimento e o tempo de PT. O teste ANOVA demonstra que a concentração de NaOH foi o factor que mais influenciou o rendimento e que a interacção entre a concentração e o tempo do PT foi muito significativa ($P < 0,01$). Não se registou uma relação significativa entre o rendimento e a força de gel (Anexo 2).

Na optimização da extracção foi estudada a influência do tempo de extracção (TE) na qualidade do produto obtido, para um PT de 3,5h e uma concentração de NaOH de 6% (parâmetros considerados óptimos para esta etapa como veremos posteriormente).

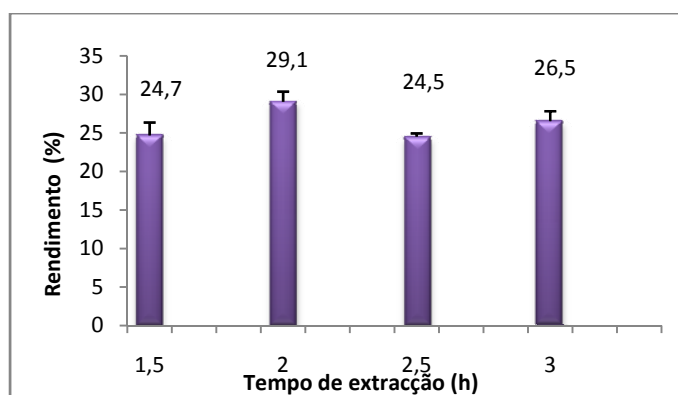


Figura 11- Rendimentos médios e respectivos erros obtidos na optimização da etapa da extracção para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.

Pela análise da Figura 11, verifica-se que o maior rendimento foi obtido para um TE de 2h e que este resultado diferiu significativamente dos restantes, não se verificando diferenças acentuadas nos rendimentos obtidos para os outros tempos. O teste ANOVA indica que o TE influenciou significativamente a variável rendimento. Os rendimentos referentes a cada extracção encontram-se compilados na Tabela A1, *Anexo 1*.

3.3.2. Propriedades mecânicas do gel

A força do gel aumentou com o aumento da concentração de NaOH, até aos 6%. Na transição dos 6 para os 8% registou-se uma similitude nos valores, ($194,1 \pm 56,6$ e $679,3 \pm 54,2$) e ($397,2 \pm 72,7$ e $668,8 \pm 72,0$) g/cm^2 , respectivamente, Figura 12.

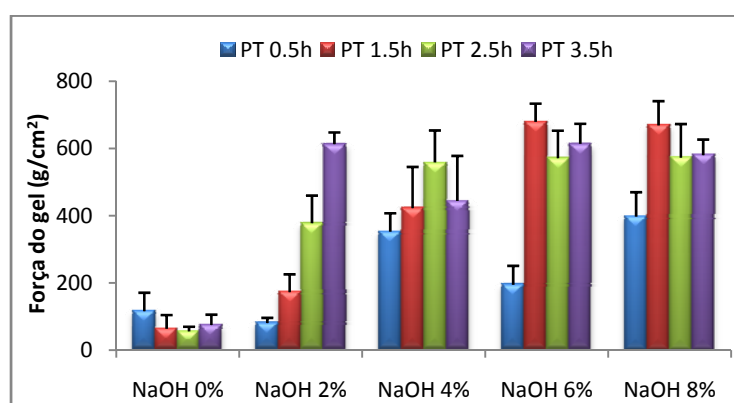


Figura 12- Forças dos géis médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.

Estes resultados mostram que o PT alcalino melhorou as propriedades gelificantes do extracto. O valor máximo da força do gel, ($679,3 \pm 54,2$) g/cm^2 , ocorreu para uma concentração de NaOH 6% e um tempo de PT de 1,5h, ao contrário do relatado por Arvizu-Higuera et al. (2007) que para a mesma espécie de algas, registou um valor máximo da força ($1064 g/cm^2$) para 0,5h de PT e concentração de NaOH igual a 7%. Ao contrário do que é relatado por estes autores, não se verificou uma diminuição da força do gel com o aumento do tempo do PT. Os resultados obtidos para 0,5h de PT foram significativamente diferentes dos restantes.

Meena et al. (2007), num estudo relativo a outras espécies de *Gracilaria* (*G. edulis*, *G. crassa*, *G. foliifera*, *G. corticata*) reportaram valores de força do gel para uma concentração de NaOH 6% e um PT com duração de 2h tipicamente inferiores, Tabela 3.

A concentração de NaOH foi o factor que mais influenciou a força do gel e a sua interacção com o tempo do PT foi muito significativa ($P < 0,01$), Anexo 2.

Tabela 3 – Forças dos géis obtidas por Meena et al. (2007) para as espécies *G.edulis*, *G.crassa*, *G.foliifera* e *G. corticata* para uma concentração de NaOH de 6%. (Temp. do PT 90°C e duração de 2h; Temp. da extracção de 120°C e duração de 1,5h).

Espécies <i>Gracilaria</i>	Força do gel (g/cm^2)
<i>edulis</i>	$340 \pm 8,56$
<i>foliifera</i>	$120 \pm 8,56$
<i>crassa</i>	$640 \pm 16,68$
<i>corticata</i>	$100 \pm 7,72$

Na optimização da extracção verificou-se uma diminuição da força do gel com o aumento do TE registando-se um máximo de $(635,8 \pm 149,0) \text{ g}/\text{cm}^2$ para um tempo de 1,5h, Figura 13. O TE influenciou marginalmente a força do gel ($P < 0,05$ mas não muito inferior). As forças de gel registadas para tempos de extracção de 1,5 e 2h não são significativamente diferentes; o mesmo acontece para 2,5h e 3h.

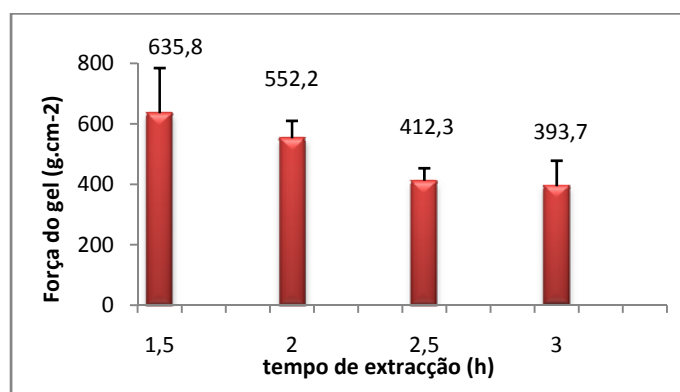


Figura 13– Forças dos géis médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa de extracção, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.

3.3.3. Análises reológicas

As menores T_f e T_g foram registadas para o agar extraído sem PT alcalino, Figuras 14 e 15. Este facto pode estar relacionado com o processo de gelificação onde a transição termorreversível do agar pode ter sido altamente perturbada pela presença de grupos carregados, como os sulfatos, que podem interferir nas ligações intermoleculares de hidrogénio (Freile-Pelegrín & Robledo, 1997). Esta explicação é corroborada pela forte relação inversa verificada entre as temperaturas de transição do gel e o teor em sulfato (Pearson). Os valores mais elevados de T_f e T_g para o agar sem PT foram respectivamente,

($70,0 \pm 2,6$) e ($26,4 \pm 0,6$) °C e registaram-se para 0,5h de PT. Na transição da concentração de NaOH de 0% para 2% verificou-se um aumento acentuado nas duas temperaturas, sendo que para concentrações superiores a 2% não se encontraram diferenças significativas entre os resultados obtidos (Anexo 2).

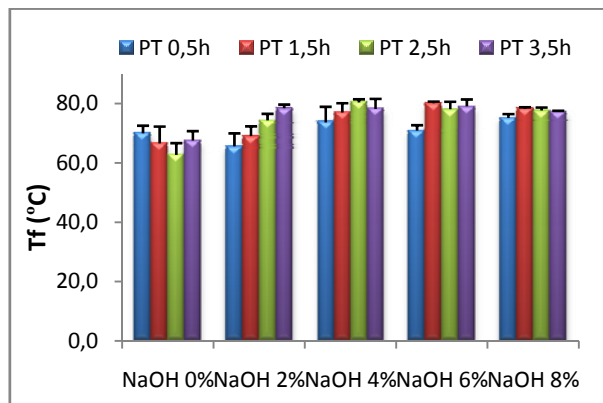


Figura 14- Tg médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.

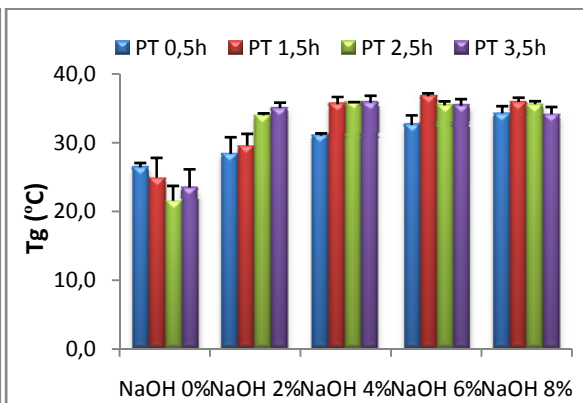


Figura 15- Tf médias e respectivos erros obtidos na optimização da etapa do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.

Para o agar extraído com PT alcalino, para uma mesma concentração, as Tg e Tf foram menores para tempos inferiores de PT, e a partir de 0,5h não se registaram diferenças significativas entre os resultados obtidos. A maior firmeza inerente aos géis com PT alcalino, estruturas com maior teor em 3,6-AG, faz com que as transições de fase dos géis sejam mais difíceis de ocorrer, facto comprovado pelas fortes relações directas verificadas entre o teor em 3,6-AG e as temperaturas em estudo, e entre estas e a força do gel (Pearson). Os valores mais elevados de Tf situaram-se perto dos 78-80°C e Tg entre os 35-36°C, sendo inferiores aos reportados por Arvizu-Higuera et al. (2007) para a mesma espécie de algas.

O teste ANOVA indicou que a concentração do PT foi o parâmetro que mais influenciou as temperaturas de transição de fase dos géis e verificou-se uma interacção significativa entre este parâmetro e o tempo de PT.

As temperaturas de transição de fase dos géis relativas à optimização da etapa de extracção propriamente dita, são apresentadas nas Figuras 16 e 17. Podemos constatar que as temperaturas de gelificação e fusão do gel não variaram significativamente com o tempo de extracção, facto comprovado pelo teste ANOVA ($P > 0,05$). Ao contrário do relatado por Arvizu-Higuera et al. (2007) não se registaram diferenças significativas nas Tg e Tf obtidas quando se variou o tempo de extracção.

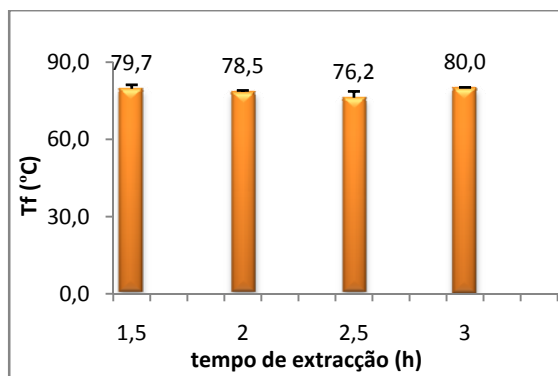


Figura 16- Tf médias e respectivos erros obtidos na otimização da etapa de extração, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.

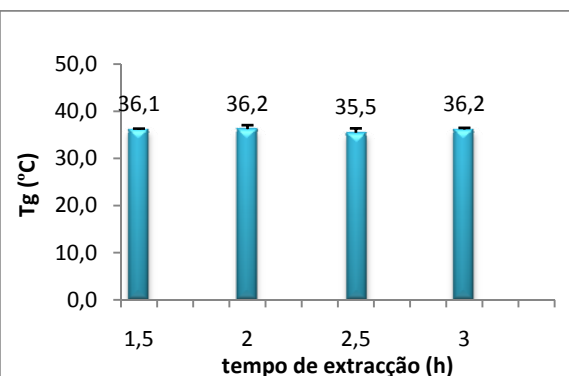


Figura 17- Tg médias e respectivos erros obtidos na otimização da etapa de extração, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.

3.3.4. Teor em sulfato e em 3,6-anidrogactose

Os agares extraídos sem PT registaram valores de teor em sulfato e 3,6-AG entre, $(2,22 \pm 0,12 - 2,42 \pm 0,11)\%$ e $(29,72 \pm 1,74 - 32,17 \pm 3,31)\%$, respectivamente. Estes produtos, com menor poder gelificante, registaram um teor em sulfato mais elevado, e consequentemente, uma percentagem de 3,6-AG inferior, pois a ausência do PT alcalino impediu a conversão das moléculas sulfatadas de D-galactose na 3,6-anidro-L-galactose, Figuras 18 e 19. Estes resultados foram significativamente diferentes dos obtidos para outras concentrações.

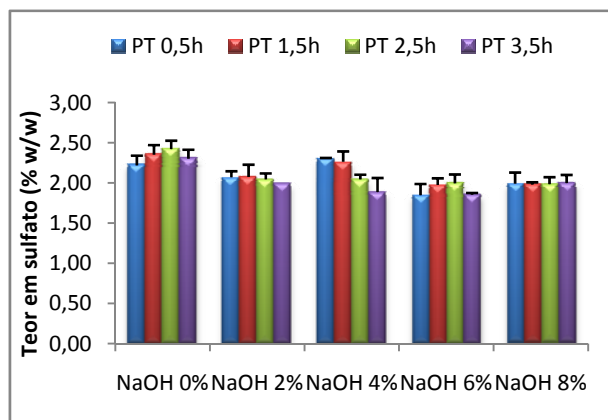


Figura 18- Teores em sulfato e respectivos erros obtidos na otimização do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.

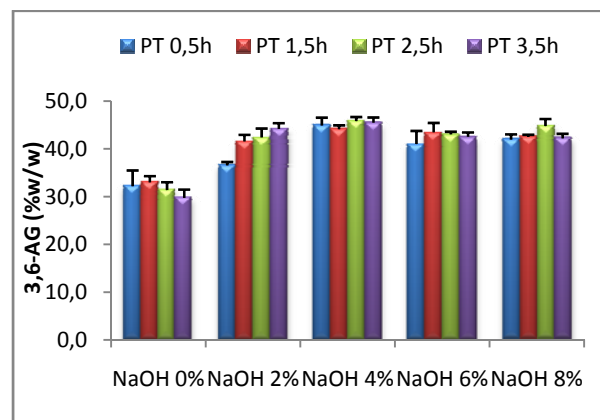


Figura 19- Teores em 3,6-AG e respectivos erros obtidos na otimização do PT para as concentrações e tempos de PT em estudo, para um TE de 2h.

Contrariamente, para a concentração de 6% que conduziu a géis mais fortes, registaram-se os menores valores de teor em sulfato entre, $(1,85 \pm 0,14 - 2,00 \pm 0,11)\%$ e os maiores de 3,6-AG, $(41,00 \pm 2,74 - 43,45 \pm 1,97)\%$. Não se registaram diferenças significativas nos resultados das duas variáveis quando passamos de uma concentração de 6 para 8%.

Arvizu-Higuera et al. (2007), para a mesma espécie de algas registou valores de 3,6-AG mais elevados, atingindo um máximo (48,9%) para uma concentração do meio alcalino de 7% a 1h de PT descendo até um mínimo (38,9%) para um PT de 3h. Contrariamente, no presente trabalho, após 0,5h de PT não se registaram diferenças significativas nos resultados obtidos. A análise estatística revelou uma relação inversa entre a força do gel e o teor em sulfato, e uma elevada correlação deste com a percentagem de 3,6-AG, tal como verificado por Freile-Pelegrín & Robledo (1997).

Novamente, a concentração de NaOH foi o parâmetro que mais influenciou os resultados obtidos e a sua interação com o tempo de PT foi também bastante significativa. Tal como seria de esperar, o teor em sulfato e em 3,6-AG correlacionaram-se negativamente.

No que diz respeito à optimização da extracção constatou-se que não houve uma diferença significativa entre os resultados obtidos para os teores em sulfato e 3,6-AG quando foi variado o TE, Figuras 20 e 21. Tal facto é comprovado pela análise estatística realizada.

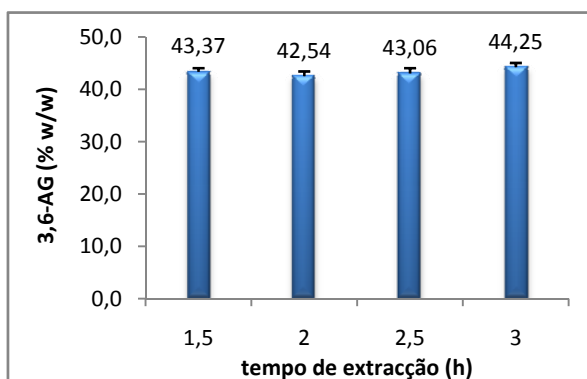


Figura 20- Teores em sulfato médios e respectivos erros obtidos na optimização da etapa de extracção, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.

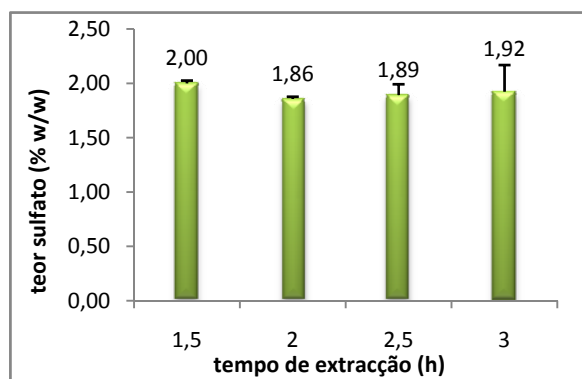


Figura 21- Teores em 3,6-AG médios e respectivos erros obtidos na optimização da etapa de extracção, para uma duração de PT 3,5h e concentração de NaOH 6%.

Estes resultados são contrários aos verificados por Arvizu-Higuera et al. (2007) que para a mesma espécie de alga, obtiveram uma relação directa entre o teor de 3,6-AG e o TE, registando os valores menores para tempos de extracção inferiores, e vice-versa.

Os resultados relativos a estas variáveis encontram-se compilados na Tabela D1, *Anexo 1*.

3.4. Parâmetros óptimos

O rendimento sofreu um ligeiro decréscimo na transição da concentração de NaOH de 6% para 8%, Figura 10. As duas concentrações produziram géis com forças muito semelhantes, Figura 12. Tendo em conta que estas são as duas variáveis com maior peso na optimização,

podemos inferir que a concentração de NaOH de 6% será um dos parâmetros óptimos. Entre os tempos de PT considerados os melhores resultados registaram-se para os tempos mais elevados, ou seja, 2,5 e 3,5h. Para estes tempos não se verificaram diferenças significativas nos resultados obtidos para todas as variáveis estudadas com excepção do teor em sulfato, que foi significativamente diferente para 3,5h. No que concerne à duração da etapa extractiva, o tempo de 2h foi o que conduziu aos melhores resultados. Após o cruzamento entre os resultados e a análise estatística efectuada podemos concluir que os melhores resultados se registaram para um PT com concentração de NaOH de 6% e duração 3,5h e uma extracção de 2h.

3.5. Conclusões

A concentração do meio alcalino foi o factor que mais influenciou as variáveis dependentes. Os parâmetros óptimos determinados para a extracção do agar da *G.vermiculophylla* da Ria de Aveiro foram: concentração de NaOH 6%, tempo de PT 3,5h e TE 2h. Todos os rendimentos obtidos situaram-se acima do valor mínimo requerido para uso industrial 8% (Freile-Pelegrín & Robledo, 1997) e foram muito superiores aos relatados por outros autores para a mesma espécie, no entanto, as forças dos géis obtidas foram ligeiramente inferiores. Isto sugere que estas variáveis dependem essencialmente da localização da alga, época em que é apanhada e dos métodos de extracção aplicados (Arvizu-Higuera et al., 2007). A força de gel para o agar optimizado foi de $(614,2 \pm 59,3) \text{ g/cm}^2$ inferior aos 700 g/cm^2 reconhecidos industrialmente como forças de gel para agares de grande qualidade no mercado internacional (Pereira-Pacheco et al., 2007). Este valor padrão refere-se ao agar da *Gelidium*, espécie usada industrialmente na produção de agar de qualidade superior. Tendo em conta que a força de gel registada para a alga estudada foi bastante próxima deste valor standard e que a *Gracilaria* é de mais fácil cultivo, mais barata e que em Portugal existe em muito maior quantidade, a sua utilização em detrimento da *Gelidium* será uma boa opção comercial. Os agares sem PT registaram forças de gel na gama requerida para aplicação industrial em alimentos de textura macia, $(30 - 200) \text{ g/cm}^2$ (Pereira-Pacheco, 2007). A *G.vermiculophylla* da Ria de Aveiro apresentou forças de gel superiores às de outras espécies, *G.crassa*, *G.foliifera*, *G.corticata* e *G.edulis*. A temperatura de fusão obtida para o produto óptimo foi de $(78,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, valor abaixo do padrão imposto para uso em

microbiologia ($>85^{\circ}\text{C}$). Por outro lado, a T_g de $(36,2\pm 0,9)^{\circ}\text{C}$ e o teor em sulfato de $(1,86 \pm 0,02)\%$, inferior a 4%, revelam que o produto óptimo é adequado para uso na indústria alimentar.

Com o seu grande poder gelificante e simplicidade de extracção, o agar da *G.vermiculophylla* pode ser utilizado como agente espessante e gelificante na indústria alimentar. Também a abundância de matéria-prima (*G.vermiculophylla*) em Portugal e a possibilidade da sua aquisição a muito baixo custo tornam os resultados obtidos bastante promissores.

Com os parâmetros óptimos determinados procedeu-se a uma extracção em maior escala e aplicou-se o agar obtido na produção de filmes biodegradáveis e o resíduo das algas proveniente da filtração foi aplicado no estudo da biossorção de metais pesados (Pb(II)).

4. Produção e caracterização dos filmes obtidos a partir do produto otimizado

4.1. Materiais

Os filmes de agar otimizado foram comparados com filmes de agar comercial (Sigma, *Gelidium*) e caracterizados em termos das propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e ao oxigénio, e ainda, higroscopicidade.

4.2. Métodos experimentais

4.2.1. Produção dos filmes

4.2.1.1. Preparação das soluções

Prepararam-se soluções 1,5% em massa do produto óptimo purificado, com água destilada. As misturas iniciais foram aquecidas (aprox. 90°C) e agitadas até total solubilização do produto (mínimo 30 minutos). Como as soluções de agar são caracteristicamente pouco viscosas e possuem um elevado poder gelificante foram necessários alguns ensaios preliminares para decidir sobre qual a concentração mais conveniente à obtenção de filmes.

4.2.1.2. Preparação dos filmes pela técnica “knife coating”

Para a produção dos filmes de agar foi utilizada a técnica de “knife coating”, Figura 22,



Figura 22 – Técnica “knife coating”.

método semi-contínuo que possui a vantagem de produzir filmes com espessura mais uniforme garantindo uma maior reprodutibilidade das propriedades estudadas. O tempo de secagem dos filmes é reduzido ($\approx$ 2 horas) (Larotonda, 2007).

As soluções de agar foram espalhadas num prato de acrílico com um aplicador automático de filmes (*Sheen, modelo 1132N*) a uma velocidade de aplicação constante de 300 mm/s. O controlo da espessura foi feito através de uma peça de equipamento colocada sobre a placa de acrílico, de forma a espalhar-se uniformemente a solução do biopolímero sobre o suporte. Os filmes obtidos foram deixados a secar à temperatura ambiente com a ajuda de uma ventoinha. Para se obter um espalhamento mais uniforme e um tempo de secagem inferior com este tipo de método, deve-se geralmente usar soluções concentradas (cerca de 10%). Contudo, devido ao grande

poder gelificante do agar foram preparadas soluções de menor concentração de maneira a ser possível espalhar a solução biopolimérica na placa. Este facto não afectou a uniformidade dos filmes obtidos.

4.2.2. Caracterização dos filmes

4.2.2.1. Medição da espessura

Depois de retirados os filmes do suporte mediu-se a sua espessura através de um aparelho de medição de espessuras (*Digimatic Indicator ID-H da Mitutoyo Co.*).

4.2.2.2. Propriedades higroscópicas. Isotérmicas de sorção

As isotérmicas de sorção de água foram determinadas pelo método gravimétrico tal como descrito por Larotonda (2007). Cortaram-se amostras dos filmes de agar otimizado e comercial com dimensões $2,5\text{cm} \times 2,5\text{cm}$ e colocaram-se numa câmara de vácuo a 60°C durante 24h; determinou-se o peso seco de cada filme. Posteriormente colocaram-se os filmes em câmaras com diferentes actividades de água impostas pelo uso de soluções saturadas de sais, Tabela 4, a temperatura controlada, 25°C , e pesaram-se os filmes de 24 em 24h até a sua massa estabilizar. Determinou-se assim a massa de água adsorvida pelos filmes a diferentes a_w . Os resultados foram posteriormente ajustados ao modelo de GAB (ver parágrafo 2.7.2.1.).

Tabela 4 - Actividades da água das soluções saturadas de sais a 25°C (Labuza, 2002; Larotonda, 2007).

sal	LiCl	MgCl ₂	Mg(NO ₃) ₂	NaBr	SrCl ₂	NaCl	(NH ₄) ₂ SO ₄	KCl	BaCl ₂
a_w	0,113	0,328	0,534	0,576	0,709	0,753	0,803	0,843	0,903

4.2.2.3. Permeabilidade ao vapor de água (WVP)

O procedimento relativo à determinação da permeabilidade ao vapor de água (*WVP*) foi idêntico ao descrito por Larotonda (2007). Cortaram-se dois filmes circulares de cada tipo de agar com diâmetro 85 mm . Colocaram-se no exsicador a humidade relativa controlada (53%) e à temperatura ambiente. Os filmes foram sujeitos a estas condições durante pelo menos 3 dias para que se encontrassem nas mesmas condições aquando da análise. Posteriormente, os discos dos filmes foram posicionados nas painéis adequadas para este tipo de testes e fixados com o auxílio de parafusos. A área do filme exposta foi constante e

igual a $0,003 \text{ m}^2$. As panelas seladas foram pesadas de hora a hora. A taxa de transmissão do vapor de água ($WVTR$) foi calculada a partir do declive da zona linear do gráfico, *massa de água vs. tempo* (condições estacionárias do filme). Sabendo a espessura média do filme determinou-se a WVP pela equação (2.16).

4.2.2.4. Permeabilidade ao oxigénio (OP)

Os testes de velocidade de transmissão do O_2 foram efectuados recorrendo a um método estático de forma a simular uma situação de “embalagem real”, tal qual o descrito por Larotonda (2007). Cortaram-se amostras de filmes (2 *Gracilaria*+2 comercial) com 90 mm de diâmetro e colocaram-se num exsiccador a humidade controlada (53%) durante pelo menos 3 dias. Os discos foram presos e selados numa célula de difusão com uma abertura circular de área conhecida, $0,0046 \text{ m}^2$. Para medir a velocidade de difusão do O_2 através do filme, fez-se passar um volume de He na célula de volume V durante um período de tempo t , até não se registarem vestígios detectáveis de O_2 na célula. De seguida fecharam-se as válvulas dando início ao teste. Em determinados intervalos de tempo, foram retiradas amostras e a concentração de O_2 foi medida usando um medidor de gás Check Mate II (PBI Dansensor, Dinamarca), permitindo o cálculo da quantidade de gás que atravessou o filme durante esse período de tempo. O sistema foi calibrado com folhas de alumínio com o intuito de verificar possíveis fugas e os dados obtidos foram ajustados ao modelo Box-Lucas, expresso pela seguinte equação,

$$y = a(1 - e^{-bx}) \quad (4.1)$$

onde x é a variável independente, neste caso, o tempo, a e b são parâmetros do modelo com b entre 0 e 1 e y é a percentagem de O_2 de vazamento através da célula. A equação obtida pelo ajuste ao modelo foi usada para corrigir os resultados obtidos para os filmes testados,

$$\% O_2 = 27,3(1 - e^{-0,00005t}) \quad (4.2)$$

Sabendo a espessura dos filmes a permeabilidade ao O_2 foi calculada a partir da equação (2.18).

4.2.2.5. Propriedades mecânicas

Foram cortados filmes de cada amostra em estudo (5 agar *Gracilaria* + 5 agar comercial) com

dimensões $25\text{ mm} \times 100\text{ mm}$. De seguida foram equilibrados num exsiccador a humidade controlada (53%), antes de se dar início aos testes de tracção. Como as propriedades



Figura 23 – Testes de tracção.

mecânicas dos filmes são fortemente influenciadas pela humidade relativa do ambiente foi fundamental acondicioná-los para que se encontrassem nas mesmas condições aquando do teste. Para a realização dos testes mecânicos utilizou-se o texturómetro *TAXT2* (*Stable Micro Systems*) equipado com um dispositivo de medição de tensão apropriado, Figura 23.

As amostras referidas foram sujeitas a uma deformação de $0,2\text{ mm/s}$ sendo registado no aparelho de aquisição de dados a força em função da distância.

4.3. Resultados e Discussão

Os filmes de agar otimizado foram comparados com os filmes de agar comercial e com os filmes de outros biopolímeros já estudados (Sousa et al., 2008) mais concretamente, filmes de “Sargaço” (mistura de algas mortas existente em abundância na costa portuguesa composta maioritariamente por *Laminaria*, fonte de alginato), alginato comercial e κ -carragenina (*Mastocarpus stellatus*). Sempre que possível foram também comparados com polímeros sintéticos como o celofane e polietilenos de alta e baixa densidade, sendo este último o mais comum nas aplicações industriais.

4.3.1. Propriedades higroscópicas. Isotérmicas de sorção

Os resultados experimentais foram ajustados ao modelo de GAB por regressão não linear recorrendo ao software *Statistica*, Figura 24.

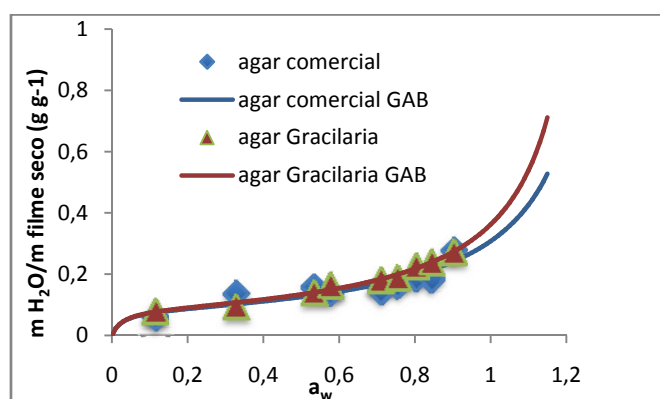


Figura 24 – Massa de água adsorvida por massa seca de filme em função da a_w e respectivo ajuste pelo modelo de GAB, para os filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial.

Os valores obtidos para os parâmetros do modelo e para o coeficiente de correlação (r^2) encontram-se descritos na Tabela 5. São ainda apresentados os parâmetros relativos a outros filmes já estudados.

Tabela 5 - Parâmetros C , k , X_0 e r^2 para os filmes de agar otimizado e agar comercial (presente estudo) e para os filmes de “Sargaço”, alginato comercial e κ -carragenina (Sousa & Martins, 2007).

	C	k	X_0 (g H ₂ O/g filme seco)	r^2
Agar <i>Gracilaria</i>	47,469	0,765	0,085	0,991
Agar comercial	52,354	0,734	0,081	0,890
Alginato comercial	13,314	0,969	0,075	0,985
κ -Carragenina	3,904	0,883	0,068	0,965
“Sargaço”	0,241	0,896	0,515	0,997

As isotérmicas obtidas para os filmes de agar em estudo apresentaram uma forma sinusoidal, Figura 25. Verificou-se que para uma dada a_w os filmes adsorveram quantidades de água idênticas. Os valores de k (<1) e r^2 ($>0,980$) mostram que o modelo de GAB ajustou bem os resultados obtidos, para o filme de agar otimizado. Contrariamente, os resultados do agar comercial não foram bem ajustados pelo modelo ($r^2 = 0,890$). Os valores dos três parâmetros de GAB (C, k, X_0) foram semelhantes para os dois filmes. A constante de Guggenheim (C) está relacionada com a diferença de potencial químico entre as moléculas adsorvidas na monocamada (1^{os} sítios sorvidos) e nas camadas de sorção superiores. Os dois filmes de agar revelaram constantes semelhantes demonstrando um equilíbrio do sistema idêntico para uma dada actividade. Os valores de X_0 , correspondente ao número de sítios activos de sorção na monocamada aos quais as moléculas de água se podiam ligar, foram idênticos para os dois filmes. Comparativamente a outros biopolímeros já estudados, os filmes de agar adsorveram menos água para uma dada a_w (Sousa & Martins, 2007). As constantes C e k também diferiram bastante dos valores registados para os filmes de “Sargaço”, κ -carragenina e alginato comercial, sendo a diferença mais acentuada relativamente aos filmes de “Sargaço”, filmes com maior poder de adsorção. Este facto deve-se ao menor poder hidrofílico do agar relativamente aos restantes biopolímeros. Esta característica constitui uma vantagem dos filmes de agar no que diz respeito à aplicação a embalagens de alimentos.

A quantidade de água adsorvida faz aumentar o carácter plastificante do filme estando relacionada com as propriedades mecânicas dos filmes.

4.3.2. Permeabilidade ao vapor de água (WVP)

As taxas de transmissão do vapor de água através dos filmes (*WVTR*) de agar otimizado ($0,229 \pm 0,004$) *g/h* e agar comercial ($0,241 \pm 0,001$) *g/h* foram idênticas, Figura 25. Os filmes exibiram ainda permeabilidades semelhantes, respectivamente, $(3,5 \pm 0,6) \times 10^{-11}$ e $(3,4 \pm 0,4) \times 10^{-11}$ *g.m⁻¹s⁻¹Pa⁻¹*, Figura 26.

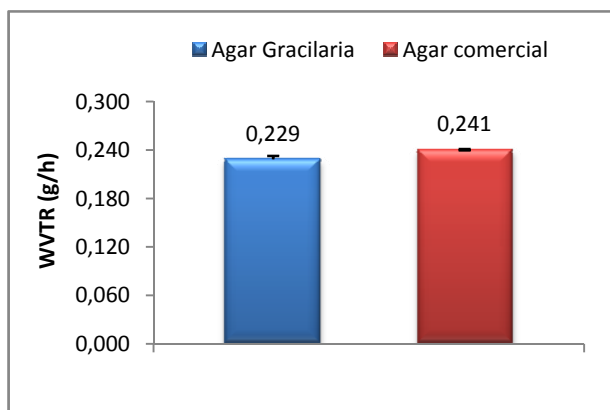


Figura 25- Taxa de transmissão do vapor de água através dos filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial e respectivo erro.

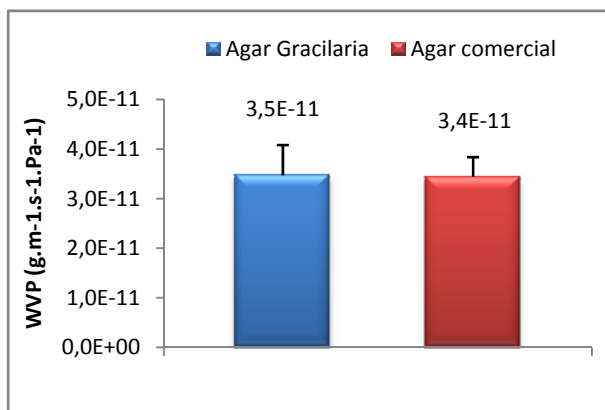


Figura 26- Permeabilidade ao vapor de água e respectivo erro dos filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial.

Comparando os resultados obtidos dos filmes em estudo com os de outros biopolímeros, constata-se que os filmes de agar foram menos permeáveis à água que os filmes de “Sargaço”, alginato comercial e κ -carragenina (Sousa & Martins, 2007). Os filmes de agar do produto otimizado revelaram ainda uma permeabilidade inferior à do celofane, e superior à do polietileno de baixa densidade, polímero sintético mais comum na produção de embalagens, Tabela 6.

Tabela 6 – Permeabilidade ao vapor de água para alguns biopolímeros e polímeros sintéticos.

Polímero	WVP (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
“Sargaço”	$2,6 \times 10^{-10}$ (Sousa & Martins 2007)
Alginato comercial	$1,2 \times 10^{-10}$ (Sousa & Martins 2007)
κ -Carragenina	$1,1 \times 10^{-10}$ (Sousa & Martins 2007)
Agar <i>G. vermiculophylla</i>	$3,5 \times 10^{-11}$ (presente estudo)
Agar comercial	$3,4 \times 10^{-11}$ (presente estudo)
Celofane	$8,4 \times 10^{-11}$ (Phan et al., 2005)
Polietileno de baixa densidade	$9,1 \times 10^{-13}$ (Larotonda, 2007)
Polietileno de alta densidade	$2,3 \times 10^{-13}$ (Larotonda, 2007)

4.3.3. Permeabilidade ao oxigênio (OP)

Os dois filmes de agar apresentaram taxas de transmissão (*OTR*) e permeabilidades ao O₂ (*OP*) semelhantes, Figuras 27 e 28, porém, o erro associado ao teste do filme de agar

comercial é bastante elevado, o que não seria de esperar, devido à uniformidade inerente aos produtos comerciais.

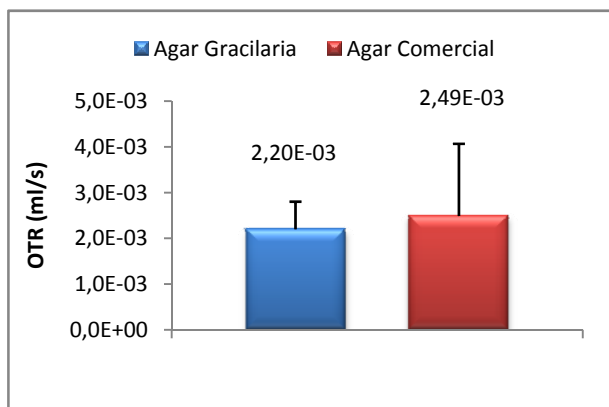


Figura 27- Taxa de transmissão de O₂ através dos filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial e respectivo erro.

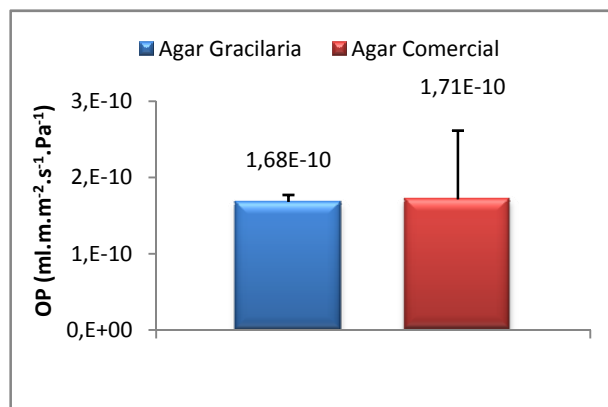


Figura 28- Permeabilidade ao O₂ e respectivo erro para os filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial.

Comparativamente ao celofane e polietilenos de alta e baixa densidade os filmes estudados apresentaram valores superiores de *OP*, como indicado na Tabela 7. As propriedades de barreira de substâncias não polares como é o caso do O₂ estão directamente relacionadas com o carácter hidrofílico do filme. A maior *OP* registada para os filmes de agar poderá estar relacionada com o seu carácter menos hidrofílico.

Tabela 7 – Permeabilidade ao O₂ para os filmes em estudo e para alguns polímeros sintéticos. (fonte: Larotonda, 2007).

	condições do teste	OP (ml m m ⁻² s ⁻¹ Pa ⁻¹)
Agar <i>G.vermiculophylla</i>	23 °C; H.R. 53%	1,68x10 ⁻¹⁰
Agar comercial	23 °C; H.R. 53%	1,71x10 ⁻¹⁰
Celofane	23 °C; H.R. 50%	2,92x10 ⁻¹²
Polietileno de baixa densidade	23 °C; H.R. 50%	2,16x10 ⁻¹¹
Polietileno de alta densidade	23 °C; H.R. 50%	4,94x10 ⁻¹²

4.3.4. Propriedades mecânicas

O módulo de Young (*E*) foi obtido através do declive da zona linear do gráfico *tensão vs deformação*. Desse gráfico, também foi possível retirar directamente os valores da deformação e da tensão no momento da ruptura dos filmes. Os filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial registaram características mecânicas semelhantes. O módulo de elasticidade para ambos os filmes em estudo foi bastante idêntico e elevado, como se pode observar pela Figura 29, tendo-se obtido para o filme optimizado um *E* igual a (48,7 ± 4,0) MPa e para o de agar comercial (48,5 ± 4,8) MPa. Estes valores foram mais elevados

que os obtidos para o “Sargaço” e para a κ -carragenina, sendo no entanto, inferior ao registado para o alginato comercial, Tabela 8.

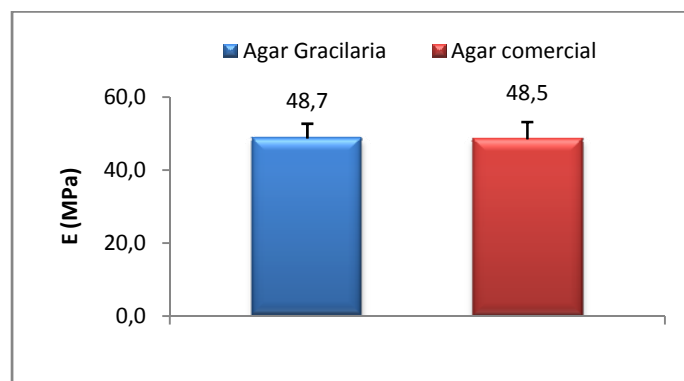


Figura 29 – Módulo de Young e respectivo erro para os filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial.

As deformações na ruptura verificadas para os filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial foram baixas, respectivamente, $(1,58 \pm 0,28) \%$ e $(1,63 \pm 0,55) \%$ e praticamente idênticas, Figura 30. A deformação dos filmes de agar foi inferior à registada para os outros biopolímeros exceptuando o alginato comercial que registou um valor menor, Tabela 8. Na mesma tabela são indicadas as tensões na ruptura para os filmes biopoliméricos, sendo que os valores registados para os filmes de agar foram muito elevados e idênticos (Figura 31), comparativamente aos outros filmes de biopolímeros.

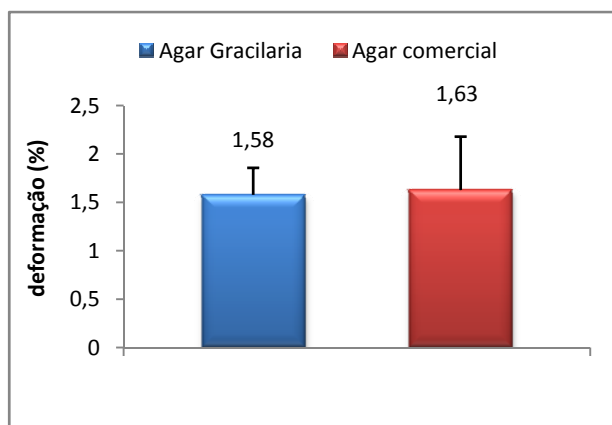


Figura 30 - Deformação na ruptura e respectivo erro para os filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial.

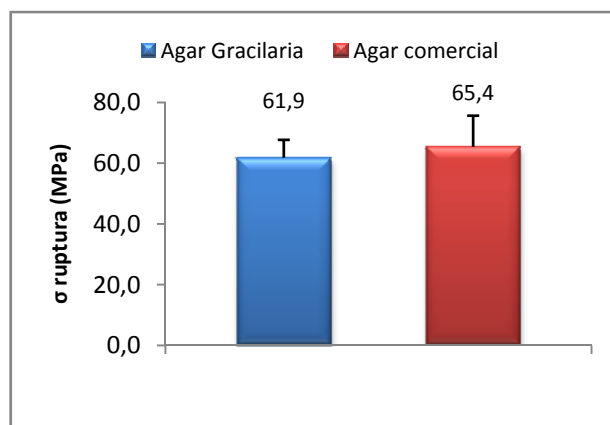


Figura 31 - Tensão na ruptura e respectivo erro para os filmes de agar da *Gracilaria* e agar comercial.

Tabela 8 - Resumo dos resultados referentes aos testes mecânicos de tracção para os filmes de agar da *Gracilaria* e de agar comercial; comparação com outros biopolímeros (Sousa & Martins, 2007).

	Agar <i>Gracilaria</i>	Agar comercial	“Sargaço”	Alginato comercial	κ -carragenina
E(MPa)	$48,7 \pm 4,0$	$48,5 \pm 4,8$	$10,5 \pm 2,8$	$60,6 \pm 3,2$	$35,7 \pm 4,0$
deformação (%)	$1,58 \pm 0,28$	$1,63 \pm 0,55$	$3,22 \pm 0,83$	$1,31 \pm 0,10$	$1,81 \pm 0,35$
σ (MPa)	$61,9 \pm 5,8$	$65,4 \pm 10,3$	$17,8 \pm 3,5$	$59,4 \pm 5,0$	$49,1 \pm 10,0$

Segundo a classificação dos materiais com base nas curvas de *tensão vs. deformação* proposta por Blaga (1973) e com base nos resultados obtidos, podemos considerar os filmes de agar, duros e quebradiços. Se por um lado, a pequena deformação na ruptura revelou o carácter quebradiço do filme, por outro, os valores elevados do módulo de Young e da tensão na ruptura foram indicativos de um filme resistente. Estes resultados são corroborados pelo estudo das propriedades higroscópicas em que os filmes de agar revelaram menor capacidade de sorção de moléculas de água, tendo consequentemente uma menor plasticidade, quebrando mais facilmente que os outros filmes de biopolímeros estudados.

4.4 Conclusões

Apesar de provenientes de géneros de algas diferentes, os filmes de agar otimizado (*Gracilaria*) e agar comercial (*Gelidium*) revelaram-se idênticos relativamente às propriedades estudadas. Comparativamente com os biopolímeros de “Sargaço”, alginato comercial e κ -carragenina, apresentaram resultados bastante promissores. A sorção de água bem como a permeabilidade ao vapor de água foram inferiores às dos restantes biofilmes. Tendo em conta que uma das principais funções da embalagem de um alimento é reduzir ao máximo a transferência de humidade entre o alimento e a atmosfera circundante, ou mesmo entre componentes de dois alimentos heterogéneos, o filme de agar da *G.vermiculophylla* apresentou resultados mais atractivos, e idênticos ao do comercial. No que concerne à permeabilidade ao vapor de água, esta foi superior à dos polietilenos de alta e baixa densidades, o que constitui uma vantagem em relação a este tipo de materiais. A permeabilidade ao oxigénio verificada para os filmes de agar comercial e otimizado foi superior à registada para filmes sintéticos. Mecanicamente os filmes de agar otimizado revelaram-se duros (elevados valores de módulo de Young e tensão na ruptura) e quebradiços (baixa deformação na ruptura). A baixa deformabilidade observada pode ser facilmente contornável com a incorporação de plastificantes. Assim sendo e devido à sua dureza, estes filmes constituem uma excelente alternativa na utilização como embalagem de alimentos, garantindo o seu bom funcionamento durante o processamento, manuseamento e armazenamento. Os filmes de agar da *G.vermiculophylla* revelaram-se uniformes, transparentes e uma alternativa barata, características importantes no que toca à produção de bioembalagens.

5. Bioissorção de metais pesados

5.1. Materiais

Foi estudada a capacidade de bioissorção de metais pesados, mais concretamente, Pb(II), pelo resíduo da alga resultante da extracção do agar da *G.vermiculophylla*.

5.2. Métodos experimentais

5.2.1. Preparação dos bioisorventes

O resíduo da alga proveniente da extracção do agar foi seco na estufa a 60°C. Para garantir a homogeneidade das partículas o resíduo foi peneirado e moído sucessivamente, utilizando-se para o efeito um peneiro (AS200 digit Retsh shaker) de porosidade 1 mm e um moinho de café.

5.2.2. Preparação das soluções

As soluções de Pb(II) foram preparadas dissolvendo uma quantidade pré-determinada de cloreto de chumbo anidro, PbCl₂ (Merck-Schuchardt, pureza > 98%) em água destilada.

5.2.3. Estudos cinéticos

A capacidade de bioissorção do resíduo foi estudada num sistema fechado, levado a cabo num reactor de vidro com 1L de capacidade. A concentração de Pb(II) inicial usada foi de 20 mg/L. O reactor foi cheio com 900 ml da solução de Pb(II) previamente preparada, ao qual se juntou 1 g de resíduo. A suspensão foi mantida homogeneizada através de um agitador magnético, com uma velocidade de agitação de 600rpm, impedindo a existência de zonas mortas no reactor e eliminando a resistência à transferência de massa externa; o pH foi monitorizado através de um medidor de pH. Foi ainda admitido que o sistema se manteve a temperatura aproximadamente constante. De forma a ser determinado o tempo de contacto necessário para atingir o equilíbrio foram retiradas amostras periódicas da solução com a ajuda de uma seringa colocada no topo do adsorvedor, anotando o pH correspondente de forma a perceber se a sua variação era significativa. Visto não se terem verificado variações bruscas no pH optou-se por não fazer o seu ajuste. As amostras colectadas foram filtradas por um filtro acoplado à seringa e o teor de Pb(II) nas soluções foi medido por espectrofotometria de absorção atómica (EAA) de chama. Sempre que

necessário diluiu-se a amostra de forma a obter concentrações na gama da curva de calibração do espectrofotómetro.

5.2.4. Estudos de equilíbrio

Conhecendo o tempo de equilíbrio do processo de bioadsorção em estudo, foram determinados os dados de equilíbrio para serem ajustados ao modelo de Langmuir e ser calculada a capacidade máxima de bioadsorção do resíduo. Foi preparada uma solução mãe de concentração de Pb(II) 250 mg/L num balão volumétrico de 2 L a partir da qual, com as diluições apropriadas, foram produzidas todas as soluções necessárias para as experiências de equilíbrio na gama de concentrações de chumbo entre $10 - 250 \text{ mg/L}$. Estas soluções foram produzidas em duplicado usando frascos Erlenmeyer sendo a massa de bioadsorvente colocada em cada uma igual a $0,1 \text{ g}$. Depois de preparadas, as soluções foram colocadas numa estufa refrigerada a temperatura e agitação constantes, e deixou-se atingir o equilíbrio. Em seguida, foram recolhidas amostras de cada solução, filtradas com a ajuda de um filtro acoplado à seringa para posterior medição das concentrações de Pb(II) nas soluções por EAA de chama. Nesta etapa, o pH foi novamente monitorizado.

5.2.5. Procedimento analítico

As concentrações de Pb(II) foram determinadas por espectrofotometria de absorção atómica (GBC 932 Plus Atomic Absorption Spectrometer) de chama. Os comprimentos de onda de trabalho foram ajustados para $5,0 \text{ mA}/217,0 \text{ nm}$ permitindo um limite de detecção de 1 ppm . A resposta do instrumento foi periodicamente verificada com soluções padrão de Pb(II). A quantidade de metal adsorvido por grama de bioadsorvente foi calculada através de um balanço material ao reactor fechado,

$$q = \frac{V(C_i - C_f)}{W} \quad (5.1)$$

onde q é a capacidade de retenção do metal pelo bioadsorvente ($\text{mg metal g}^{-1} \text{ bioadsorvente}$), C_i e C_f as concentrações iniciais e finais de metal na solução (mg L^{-1}), V o volume da solução (L) e W o peso seco do bioadsorvente adicionado (g).

5.3. Resultados e Discussão

Os resultados experimentais dos ensaios em adsorvedor fechado foram ajustados aos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem e ao modelo de equilíbrio de Langmuir, por regressão não linear, usando o programa *Fig P 2.5 da Biosoft*.

5.3.1. Estudos cinéticos

A Figura 32 mostra os resultados das experiências cinéticas conduzidas para determinar o tempo de equilíbrio, isto é, o tempo necessário para o biossorvente atingir a sua capacidade máxima de sorção. É evidente uma rápida sorção inicial relacionada com a ocupação dos sítios activos com maior afinidade para o metal e mais acessíveis fisicamente, seguida de um longo período de sorção lenta, onde são ocupados gradualmente os sítios com menor afinidade e menos acessíveis. Os resultados indicam que o equilíbrio foi atingido aproximadamente após 12h de contacto entre as partículas de resíduo e a solução de Pb(II).

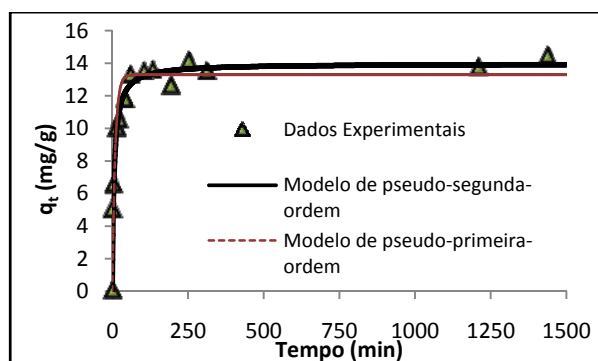


Figura 32- Concentração de espécies iônicas no biossorvente em função do tempo. Ajuste dos dados experimentais pelos modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.

Na mesma figura são apresentados os ajustes realizados aos dados experimentais, pelos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (equação 2.19) e pseudo-segunda ordem (equação 2.20). As variâncias dos ajustes foram comparadas usando o Teste-F (*Anexo 3*) e os resultados obtidos demonstram que, o modelo de pseudo-segunda ordem ajustou melhor os dados experimentais, para um nível de confiança de 95%. Na Tabela 9 são apresentados os parâmetros dos modelos cinéticos e os resultados estatísticos do ajuste (coeficiente de correlação e variância residual). A quantidade de metal retido no biossorvente no equilíbrio, q_{eq} , obtida pela equação de pseudo-segunda ordem está de acordo com o valor de q_{eq} determinado experimentalmente o que também confirma a validade do ajuste pelo modelo.

Tabela 9- Parâmetros dos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem para o resíduo estudado.

Modelo cinético pseudo-primeira ordem				
$q_{eq} \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$	$k_{1,ads} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	R^2	$S_R^2 \text{ (mg g}^{-1}\text{)}^2$	$rads(i) \text{ (mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$
$13,3 \pm 0,3$	$0,11 \pm 0,01$	0,963	0,77	1,41
Modelo cinético pseudo-segunda ordem				
$q_{eq} \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$	$k_{2,ads} \text{ (g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$	R^2	$S_R^2 \text{ (mg g}^{-1}\text{)}^2$	$rads(i) \text{ (mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$
$14,0 \pm 0,2$	$0,012 \pm 0,001$	0,987	0,24	2,30

5.3.2. Estudos de equilíbrio

O elevado coeficiente de correlação demonstra que o equilíbrio foi bem descrito pelo modelo de Langmuir (equação 2.22), Tabela 10. A curva é caracterizada por uma inclinação inicial acentuada que vai diminuindo com o aumento da concentração de Pb(II) em solução, uma vez que a quantidade de sítios de sorção livres diminui à medida que a superfície do bioissorvente é preenchida pelos íons metálicos, Figura 33.

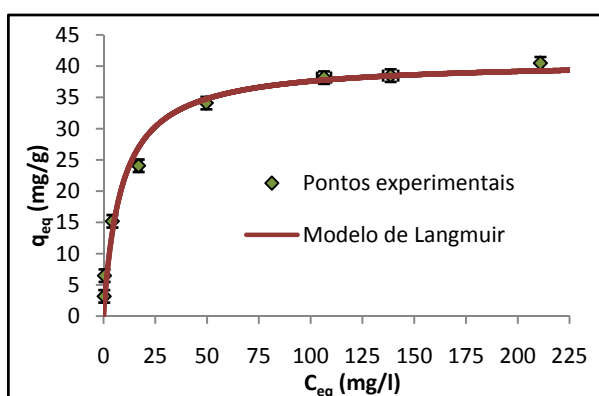

Figura 33- Isotérmica de biossorção de (PbII) do resíduo da *G.vermiculophylla* - Modelo de Langmuir.

Tabela 10- Parâmetros estimados para o modelo de Langmuir e respectivos erros.

$q_{max} \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$	$40,9 \pm 1,7$
$K_L \text{ (L mg}^{-1}\text{)}$	$0,12 \pm 0,03$
R^2	0,988
$S_R^2 \text{ (mg g}^{-1}\text{)}^2$	5,79

A capacidade máxima de retenção do bioissorvente, q_{max} , obtida pelo ajuste ao modelo de Langmuir foi de $(40,9 \pm 1,7) \text{ mg g}^{-1}$, Tabela 10, que está de acordo com o resultado experimental obtido, $(40,5 \pm 1,2) \text{ mg g}^{-1}$. Comparativamente ao resíduo estudado por Vilar (2006) resultante da extração industrial de agar da *Gelidium sesquipedale*, o resíduo da *G.vermiculophylla* registou um q_{max} semelhante. Relativamente à própria alga *Gelidium*, o resíduo em estudo apresentou uma capacidade de retenção inferior, Tabela 11.

Tabela 11- Capacidades de retenção máxima para o resíduo estudado; comparação com a alga e resíduo *Gelidium*.

biossorvente	pH	$q_{\max}$ (mg g ⁻¹)	Referência
<i>Gelidium sesquipedale</i>	5,3	64	Vilar (2006)
Resíduo extracção agar <i>Gelidium sesquipedale</i>	5,3	44	Vilar (2006)
Resíduo extracção agar <i>G.vermiculophylla</i>	5,2*	41	Presente estudo

*valor médio

5.4. Conclusões

O tempo de equilíbrio determinado para o processo de bioadsorção de Pb(II) pelo resíduo da *G.vermiculophylla* foi de, aproximadamente, 12h. O modelo cinético de pseudo-segunda ordem ajustou melhor os resultados obtidos e os dados de equilíbrio foram bem ajustados ao modelo de Langmuir. Contudo, é necessário ter a percepção de que estes constituem modelos matemáticos do fenómeno de bioadsorção e o simples facto dos pontos experimentais serem bem ajustados, não nos dá uma indicação segura do mecanismo de bioadsorção subjacente ao processo estudado.

O resíduo proveniente da extracção de agar da *G.vermiculophylla* registou uma boa capacidade de retenção máxima do chumbo, $(40,5 \pm 1,2) \text{ mg g}^{-1}$, semelhante à capacidade de bioadsorção reportada por outro autor sobre o resíduo industrial da *Gelidium sesquipedale*, no entanto, inferior à da própria da alga.

Tendo em conta que o resíduo é uma alternativa mais barata comparativamente à utilização da própria alga como biossorvente, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios.

6. Conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros

Os géis de agar da *G.vermiculophylla* (sem PT alcalino e produto otimizado) apresentaram características bastante atractivas para aplicação na indústria alimentar. Os parâmetros óptimos da extracção do agar foram: concentração de NaOH 6%, duração do PT 3,5h e 2h de extracção. Os filmes de agar otimizado apresentaram características (higroscópicas, mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e ao O₂) bastante idênticas às dos filmes de agar comercial de fonte *Gelidium*, o que vem comprovar a qualidade comercial do agar estudado. Comparativamente com outros biopolímeros já estudados (“Sargaço”, κ-carragenina e alginato comercial) os filmes do produto otimizado revelaram melhores propriedades para aplicação a embalagens de alimentos. O resíduo proveniente do processo de extracção registou uma boa capacidade de retenção do Pb(II).

Com a sua biodegradabilidade, grande poder gelificante e simplicidade do processo extractivo, o agar extraído da *G.vermiculophylla* poderá constituir no futuro, uma alternativa promissora aos materiais sintéticos e um biopolímero com inúmeras aplicações possíveis. Também a abundância de matéria-prima em Portugal e a possibilidade da sua aquisição a muito baixo custo tornam o estudo realizado de extrema importância.

Em termos de trabalho futuro, poderá ser estudada a incorporação de plastificantes nos filmes de agar estudados de forma a aproximar ainda mais as suas características mecânicas das verificadas nos plásticos sintéticos usados na indústria.

A única dificuldade verificada durante a utilização do método semi-contínuo “*knife coating*” foi no momento de colocar a solução quente de agar na placa para ser espalhada, devido ao elevado poder gelificante das soluções usadas. Uma sugestão futura, será a incorporação de um aparelho para aquecer e controlar a temperatura da placa.

Os bons resultados decorrentes desta técnica na produção dos biofilmes (maior uniformidade das películas, o que permitiu uma maior reprodutibilidade das propriedades estudadas) sugere a possibilidade da utilização deste método industrialmente, se for conseguida a sua adaptação a um processo contínuo. Futuramente poderá ser estudado um mecanismo que permita fixar o dispositivo que controla a espessura dos filmes e um sistema de roldanas em permanente movimento que permita conduzir a solução quente através do dispositivo fixo; será também necessária a incorporação de uma ventoinha que permita a secagem rápida do filme para que este seja automaticamente enrolado numa película única.

Relativamente ao processo de extracção do agar, mais concretamente, na etapa da filtração uma sugestão será a utilização de um mecanismo de filtração a pressão reduzida.

Tendo em conta que o resíduo tem tipicamente uma capacidade de bioadsorção bastante inferior à da própria alga, um estudo futuro utilizando a própria alga como bioadsorvente será de grande interesse. O estudo poderá ainda ser alargado a outros iões metálicos (Hg, Cd, Cr, entre outros), e poderá ser avaliada a influência de diferentes variáveis (pH, temperatura, concentração inicial do metal) na capacidade de retenção do bioadsorvente. Outra possibilidade será a expansão do estudo do processo de bioadsorção desenvolvido no âmbito deste projecto a outros tipos de adsorvedores, nomeadamente, adsorvedor perfeitamente agitado e em coluna de leito fixo.

7. Bibliografia

Arvizu-Higuera, D.L., Rodríguez-Montesinos, Y.E., Murillo-Álvarez, J.I., Munoz-Ochoa, M., Hernández-Carmona, G., *Effect of alkali treatment time and extraction time on agar from Gracilaria vermiculophylla*, Journal of Applied Phycology, 2007, 10811-007-9258-4.

Alves, M.M.P.M., *Estrutura e comportamento reológico de gelatinas em associação com outras gomas alimentares*, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Janeiro de 2001.

Barreto, P.L.M., Beirão, L.H., *Influência do amido e carragena nas propriedades texturais de surimi de tilápia (Oreochomis sp.)*, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1999, vol.19, nº2.

Blaga, A., *Properties and Behaviour of Plastics*, Canadian Building Digest, 1973, 157, 4.

Costa, J.M.C., Medeiros, M.F.D., Mata, A.L.M.L., *Isotermas de adsorção de pós de beterraba (Beta vulgaris L.), abóbora (Curcubita moschata) e cenoura (Daucus carota) obtidos pelo processo de secagem em leito de jorro: estudo comparativo*, Revista Ciência Agronômica, 2003, vol.34, nº1.

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.L., Guilbert, S., *Rheological model for the mechanical properties of myofibrillar protein-based films*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44, 1116-1122.

Davidson, R.L., *Handbook of Water-Soluble Gums and Resins*, McGraw-Hill, 1980.

Freile-Pelegrín, Y., Madera-Santana, T., Robledo, D., Veleza, L., Quintana, P., Azamar, J.A., *Degradation of agar films in a humid tropical climate: Thermal, mechanical, morphological and structural changes*, Polymer Degradation and Stability, 2007, 92, 244-252.

Freile-Pelegri n, Y., Murano, E., *Agars from three species of Gracilaria (Rodophyta) from Yucatán Peninsula*, Bioresource Technology, 2005, 96, 295-302.

Freile-Pelegri n, Y., Robledo, D., *Influence of alkali treatment on agar from Gracilaria cornea from Yucatán Mexico*, Journal of Applied Phycology, 1997, 9, 533-539.

Haugaard, V.K., Udsen, A.M., Mortensen, G., Hoegh, L., Petersen, K., Monahan, F., *Potential Food Applications of Biobased Materials. An EU-Concerted Action Project*, Starch/Starke, 2001, 53, 189-200.

Hilliou L., Goncalves M.P., *Gelling properties of a kappa/iota hybrid carrageenan: effect of concentration and steady shear*, International Journal of Food Science and Technology, 2007, 42,678-685.

Hilliou, L., Larotonda, L.S., Sereno, A.M., Gonçalves, M.P., *Thermal and Viscoelastic Properties of κ/ι -Hybrid Carrageenan Gels Obtained from the Portuguese Seaweed Mastocarpus stellatus*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54, 7870-7878.

Jackson, S.G., McCandless, E.L., *Simple, rapid turbidimetric determination of inorganic sulfate and/or protein*, Analytical Biochemistry, 1978, 90, 802-808.

Pacheco-Pereira, F., Robledo, D., Rodríguez-Carvajal, L., Freile-Pelegri n, Y., *Optimization of native agar extraction from Hidropuntia cornea from Yucatán Mexico*, Bioresource Technology, 2007, 98, 1278-1284.

Kain (Jones), J.M., Destombe, C., *A review of the life history, reproduction and phenology of Gracilaria*, Journal of Applied Phycology, 1995, 7, 269-281.

Larotonda, F. D. S., *Biodegradable films and coatings obtained from carrageenan from Mastocarpus stellatus and starch from Quercus suber*, Tese de Doutoramento, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Dezembro de 2007.

Marinho-Soriano, E., Bourret, E., *Effects of season on the yield and quality of agar from Gracilaria species (Gracilariaceae, Rhodophyta)*, Bioresource Technology, 2003, 90, 329-333.

Meena, R., Prasad, K., Ganesan, M., Siddhanta, A.K., *Superior quality agar from Gracilaria species (Gracilariales, Rhodophyta) collected from the Gulf of Mannar, India*, Journal of Applied Phycology, 2007, 10811-007-9272-6.

Phan, T. D., Debeaufort, F., Luu, D., Voilley, A., *Functional Properties of Edible Agar-Based and Starch-Based Films for Food Quality Preservation*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 53, 973-981.

Pereira, R., Nunes, C., Abreu, H., Correia, I., Coimbra, M.A., Abreu, A., *New Technologies to develop the potential of Ocean Resources*, Lisboa, 2008.

Quintelas, C.M.C., *Implementação e Desenvolvimento de Sistemas de Biossorção para fixação de Metais Pesados*, Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Braga, Maio de 2007.

Santos, R., Duarte, P., *Marine Plant harvest in Portugal*, Journal of applied Phycology, 1991, vol.3, number 1, 11-18.

Sousa, A.M.M., Martins, S.I.A., *O que podemos fazer com o Sargaço?*, Projecto de Investigação, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2007.

Sousa, A.M.M., Martins, S.I.A., Larotonda, F.S., Hilliou, L., Gonçalves, M.P., Sereno, A.M., *Biodegradable Polymers extracted from “Sargaço”: Films Properties and Application to Edible Coating*, 2008, Materials Science Forum, Vols. 587-588, pp 548-552.

Stephen, A.M., *Food Polysaccharides and their Applications*, Marcel Dekker Inc., New York 1995.

Torres, D.P.M., *Gelificação Térmica de Hidrolisados Enzimáticos de Proteínas do Soro do Leite Bovino, comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos*, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2005.

Villanueva, R.D., Montano N.E., Romero, J.B., Aliganga A.K.A., Enriquez, E.P., *Seasonal Variations in the Yield, Gelling Properties, and Chemical Compositions of Agars from Gracilaria eucheumoides and Gelidiella acerosa (Rhodophyta) from the Philippines*, 1999, Botanica Marina, 42, 175-182.

Vilar, V.J.P., *Remoção de Iões Metálicos em Solução Aquosa por Resíduos da Indústria de Extração de Agar*, Tese de Doutoramento, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Abril de 2006.

Vilar, V.J.P., Botelho, C.M.S., Boaventura, R.A.R., *Kinetics and equilibrium modelling of lead uptake by algae Gelidium and algal waste from agar extraction industry*, Journal of Hazardous Materials, 2007, 143, 396-408.

Vilar, V.J.P., Sebesta, F., Botelho, C.M.S., Boaventura, R.A.R., *Equilibrium and kinetic modelling of Pb^{2+} by biosorption granulated agar extraction algal waste*, Process Biochemistry, 2005, 40, 3276-3284.

Yaphe, W., Arsenault, G.P., *Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides*, Analytical Biochemistry, 1965, 13, 143-148.

www.greenpeace.org.br (relatório sobre os impactos na saúde humana de substâncias sintéticas, acedido em Março de 2008)

<http://www.fao.org/> (acedido a partir de 13 de Janeiro de 2008)

<http://www.frammandearter.se> (site sobre a espécie *Gracilaria vermiculophylla*, acedido em Abril de 2008)

Anexo 1 – Resultados do processo de optimização da extracção

Optimização do processo de extracção – variável rendimento

Tabela A1 – Rendimentos para todas as extracções consideradas, respectivas médias e erro padrão associado.

Id.	Concentração de NaOH (%)	Duração do PT (h)	TE (h)	Rendimento (g)	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)
1	0	0,5	2	0,78	19,5	17,5 ± 1,9
2	0	0,5	2	0,69	17,3	
3	0	0,5	2	0,63	15,7	
4	0	1,5	2	0,63	15,8	13,3 ± 2,3
5	0	1,5	2	0,51	12,8	
6	0	1,5	2	0,45	11,4	
7	0	2,5	2	0,56	14,0	13,9 ± 1,0
8	0	2,5	2	0,59	14,9	
9	0	2,5	2	0,51	12,8	
10	0	3,5	2	0,64	16,0	16,5 ± 2,3
11	0	3,5	2	0,58	14,5	
12	0	3,5	2	0,76	19,0	
13	2	0,5	2	1,21	30,3	30,3 ± 0,6
14	2	0,5	2	1,24	31,0	
15	2	0,5	2	1,19	29,8	
16	2	1,5	2	1,19	29,8	30,1 ± 0,8
17	2	1,5	2	1,18	29,5	
18	2	1,5	2	1,24	31,0	
19	2	2,5	2	1,16	29,0	29,4 ± 1,7
20	2	2,5	2	1,12	28,0	
21	2	2,5	2	1,25	31,3	
22	2	3,5	2	1,11	27,8	26,8 ± 0,9
23	2	3,5	2	1,07	26,8	
24	2	3,5	2	1,04	26,0	
25	4	0,5	2	0,80	19,9	26,9 ± 6,1
26	4	0,5	2	1,19	29,7	
27	4	0,5	2	1,24	31,1	
28	4	1,5	2	1,22	30,5	30,4 ± 0,4
29	4	1,5	2	1,23	30,7	
30	4	1,5	2	1,20	29,9	
31	4	2,5	2	1,02	25,5	25,3 ± 0,7
32	4	2,5	2	0,98	24,5	
33	4	2,5	2	1,03	25,8	
34	4	3,5	2	1,19	29,8	28,4 ± 1,3
35	4	3,5	2	1,13	28,3	
36	4	3,5	2	1,09	27,3	
37	6	0,5	2	1,30	32,5	33,1 ± 0,6
38	6	0,5	2	1,35	33,8	

39	6	0,5	2	1,32	33,0	
40	6	1,5	2	1,12	28,0	29,3 ± 1,1
41	6	1,5	2	1,20	30,0	
42	6	1,5	2	1,19	29,8	
43	6	2,5	2	1,16	29,0	28,1 ± 1,2
44	6	2,5	2	1,07	26,8	
45	6	2,5	2	1,14	28,5	
46	6	3,5	2	1,22	30,5	29,1 ± 1,3
47	6	3,5	2	1,15	28,8	
48	6	3,5	2	1,12	27,9	
49	8	0,5	2	1,24	31,0	31,7 ± 0,7
50	8	0,5	2	1,30	32,5	
51	8	0,5	2	1,26	31,6	
52	8	1,5	2	1,19	29,6	28,7 ± 1,3
53	8	1,5	2	1,09	27,2	
54	8	1,5	2	1,17	29,4	
55	8	2,5	2	1,15	28,7	27,1 ± 1,9
56	8	2,5	2	1,11	27,7	
57	8	2,5	2	1,00	25,0	
58	8	3,5	2	1,09	27,2	24,3 ± 2,6
59	8	3,5	2	0,93	23,2	
60	8	3,5	2	0,90	22,5	
61	6	3,5	1,5	0,91	22,8	24,7 ± 1,7
62	6	3,5	1,5	1,02	25,6	
63	6	3,5	1,5	1,03	25,7	
64	6	3,5	2,5	1,00	24,9	24,5 ± 1,3
65	6	3,5	2,5	0,98	24,5	
66	6	3,5	2,5	0,96	24,1	
67	6	3,5	3	1,11	27,8	26,5 ± 0,4
68	6	3,5	3	1,01	25,2	
69	6	3,5	3	1,06	26,6	
70	4	2	2,25	1,15	28,8	27,1 ± 1,3
71	4	2	2,25	1,04	26,1	
72	4	2	2,25	1,05	26,3	

Optimização do processo de extracção – variável força do gel

Tabela B1 – Forças dos géis para todas as extracções consideradas, respectivas médias e erro padrão associado.

Identificação	Concentração de NaOH (%)	Duração do PT (h)	TE (h)	Força do gel (g/cm ²)	Força do gel média (g/cm ²)
1	0	0,5	2	53,3	115,6 ± 55,1
2	0	0,5	2	135,5	
3	0	0,5	2	158,1	
4	0	1,5	2	107,9	63,4 ± 40,9
5	0	1,5	2	54,9	
6	0	1,5	2	27,4	
7	0	2,5	2	71,0	55,5 ± 13,9
8	0	2,5	2	51,5	
9	0	2,5	2	44,0	
10	0	3,5	2	70,5	74,8 ± 30,5
11	0	3,5	2	107,3	
12	0	3,5	2	46,7	
13	2	0,5	2	97,1	80,2 ± 15,7
14	2	0,5	2	77,2	
15	2	0,5	2	66,2	
16	2	1,5	2	154,8	172,3 ± 53,2
17	2	1,5	2	232,1	
18	2	1,5	2	130,1	
19	2	2,5	2	283,2	377,9 ± 82,1
20	2	2,5	2	429,5	
21	2	2,5	2	420,9	
22	2	3,5	2	650,6	612,9 ± 34,9
23	2	3,5	2	581,6	
24	2	3,5	2	606,6	
25	4	0,5	2	407,5	352,3 ± 55,0
26	4	0,5	2	351,9	
27	4	0,5	2	297,5	
28	4	1,5	2	510,7	422,4 ± 122,8
29	4	1,5	2	282,2	
30	4	1,5	2	474,4	
31	4	2,5	2	660,9	558,6 ± 95,3
32	4	2,5	2	472,4	
33	4	2,5	2	542,5	
34	4	3,5	2	504,1	443,7 ± 134,3
35	4	3,5	2	537,3	
36	4	3,5	2	289,8	
37	6	0,5	2	226,5	194,1 ± 56,6
38	6	0,5	2	227	
39	6	0,5	2	128,8	
40	6	1,5	2	648,9	679,3 ± 54,2
41	6	1,5	2	647,1	
42	6	1,5	2	741,8	
43	6	2,5	2	567,2	571,1 ± 82,0

44	6	2,5	2	655	
45	6	2,5	2	491,2	
46	6	3,5	2	606,0	
47	6	3,5	2	559,5	614,2 ± 59,3
48	6	3,5	2	677,2	
49	8	0,5	2	471,8	
50	8	0,5	2	393,1	397,2 ± 72,7
51	8	0,5	2	326,6	
52	8	1,5	2	545,3	
53	8	1,5	2	751,1	668,8 ± 72,0
54	8	1,5	2	617,3	
55	8	2,5	2	517,6	
56	8	2,5	2	511,9	572,6 ± 100,2
57	8	2,5	2	688,2	
58	8	3,5	2	581,7	
59	8	3,5	2	532,4	580,0 ± 46,7
60	8	3,5	2	625,7	
61	6	3,5	1,5	765,0	
62	6	3,5	1,5	472,8	635,8 ± 149,0
63	6	3,5	1,5	669,5	
64	6	3,5	2,5	419,7	
65	6	3,5	2,5	448,9	412,3 ± 40,9
66	6	3,5	2,5	368,2	
67	6	3,5	3	407,8	
68	6	3,5	3	303,2	393,7 ± 84,4
69	6	3,5	3	470,2	
70	4	2	2,25	586,9	
71	4	2	2,25	600,8	598,7 ± 10,9
72	4	2	2,25	608,3	

Optimização do processo de extracção – variáveis Tg e Tf

Tabela C1 – Temperaturas de fusão e gelificação para todas as extracções consideradas, respectivas médias e erro padrão associado.

Id.	[NaOH] (%)	Duração do PT (h)	TE (h)	Tg (°C)	Tg média (°C)	Tf (°C)	Tf média (°C)
1	0	0,5	2	26,3	26,4 ± 0,6	67,5	70,0 ± 2,6
2	0	0,5	2	25,9		72,6	
3	0	0,5	2	27,1		69,8	
4	0	1,5	2	28,2	24,9 ± 2,9	72,9	66,6 ± 5,7
5	0	1,5	2	23,7		65	
6	0	1,5	2	22,9		61,9	
7	0	2,5	2	19,1	21,6 ± 2,2	58,4	62,7 ± 4,0
8	0	2,5	2	23,1		63,5	
9	0	2,5	2	22,5		66,2	
10	0	3,5	2	24,6	23,5 ± 2,6	68,9	67,6 ± 3,1
11	0	3,5	2	25,4		69,8	
12	0	3,5	2	20,5		64	
13	2	0,5	2	30,3	28,4 ± 2,4	63	65,6 ± 4,3
14	2	0,5	2	29,2		70,6	
15	2	0,5	2	25,7		63,2	
16	2	1,5	2	27,6	29,6 ± 1,7	65,5	69,0 ± 3,3
17	2	1,5	2	30,8		72	
18	2	1,5	2	30,3		69,6	
19	2	2,5	2	33,7	34,0 ± 0,3	71,9	74,4 ± 2,2
20	2	2,5	2	34,2		76	
21	2	2,5	2	34,1		75,2	
22	2	3,5	2	35,5	35,1 ± 0,8	79,8	78,4 ± 1,2
23	2	3,5	2	35,5		77,4	
24	2	3,5	2	34,2		78,1	
25	4	0,5	2	30,8	31,0 ± 0,3	79,6	73,6 ± 5,3
26	4	0,5	2	30,9		71,6	
27	4	0,5	2	31,4		69,7	
28	4	1,5	2	36,3	35,6 ± 1,0	78,7	77,0 ± 3,0
29	4	1,5	2	34,4		73,4	
30	4	1,5	2	36,1		78,9	
31	4	2,5	2	35,8	35,8 ± 0,1	81,1	80,4 ± 1,0
32	4	2,5	2	35,8		79,2	
33	4	2,5	2	35,9		80,9	
34	4	3,5	2	36	35,8 ± 1,0	79	78,2 ± 3,4
35	4	3,5	2	36,7		81,1	
36	4	3,5	2	34,7		74,5	
37	6	0,5	2	32,7	32,6 ± 1,4	72,6	70,9 ± 1,8
38	6	0,5	2	31,1		69	
39	6	0,5	2	33,9		71,1	
40	6	1,5	2	36,7	36,8 ± 0,4	80,7	80,1 ± 0,6
41	6	1,5	2	37,2		79,6	

42	6	1,5	2	36,4		80	
43	6	2,5	2	34,8	35,4 ± 0,6	75,5	78,1 ± 2,5
44	6	2,5	2	35,6		80,5	
45	6	2,5	2	35,9		78,3	
46	6	3,5	2	36,2	35,4 ± 1,0	79,6	79,1 ± 2,3
47	6	3,5	2	34,3		76,6	
48	6	3,5	2	35,6		81,1	
49	8	0,5	2	35,4	34,3 ± 1,0	76,6	75,2 ± 1,3
50	8	0,5	2	34,1		74,1	
51	8	0,5	2	33,4		74,8	
52	8	1,5	2	36	35,9 ± 0,6	78	78,4 ± 0,4
53	8	1,5	2	35,3		78,7	
54	8	1,5	2	36,5		78,5	
55	8	2,5	2	36,1	35,6 ± 0,4	78,2	77,7 ± 1,0
56	8	2,5	2	35,4		78,3	
57	8	2,5	2	35,3		76,6	
58	8	3,5	2	34,9	34,2 ± 1,0	77,5	77,3 ± 0,2
59	8	3,5	2	34,6		77,1	
60	8	3,5	2	33,0		77,4	
61	6	3,5	1,5	36,3	36,1 ± 0,2	81,3	79,7 ± 1,5
62	6	3,5	1,5	35,9		78,3	
63	6	3,5	1,5	36,2		79,5	
64	6	3,5	2,5	37,1	36,2 ± 0,9	79,1	78,5 ± 0,5
65	6	3,5	2,5	36,2		78,4	
66	6	3,5	2,5	35,4		78,1	
67	6	3,5	3	35,9	35,5 ± 0,9	77,7	76,2 ± 2,5
68	6	3,5	3	34,4		73,4	
69	6	3,5	3	36,1		77,6	
70	4	2	2,25	36,4	36,2 ± 0,3	79,8	80,0 ± 0,2
71	4	2	2,25	36,3		80,1	
72	4	2	2,25	35,8		80,2	

Optimização do processo de extracção – variáveis teor em sulfato e 3,6-AG

Tabela D1 – Teores em sulfato e em 3,6-AG para todas as extracções consideradas, respectivas médias e erro padrão associado.

Id.	[NaOH] (%)	Duração PT (h)	TE (h)	Sulfato (% w/w)	Sulfato médio (% w/w)	3,6-AG (%)	3,6-AG médio (%)
1	0	0,5	2	2,08	2,22 ± 0,12	31,80	32,17±3,31
2	0	0,5	2	2,30		29,06	
3	0	0,5	2	2,28		35,65	
4	0	1,5	2	2,39	2,35 ± 0,12	31,47	32,98±1,30
5	0	1,5	2	2,22		33,72	
6	0	1,5	2	2,45		33,74	
7	0	2,5	2	2,42	2,42 ± 0,11	30,92	31,37±1,64
8	0	2,5	2	2,53		30,01	
9	0	2,5	2	2,32		33,19	
10	0	3,5	2	2,26	2,30 ± 0,11	29,20	29,72±1,74
11	0	3,5	2	2,43		31,67	
12	0	3,5	2	2,22		28,3	
13	2	0,5	2	2,13	2,07 ± 0,07	35,71	36,54±0,72
14	2	0,5	2	2,10		36,92	
15	2	0,5	2	1,99		36,99	
16	2	1,5	2	2,21	2,08 ± 0,15	43,07	41,55±1,37
17	2	1,5	2	1,91		40,40	
18	2	1,5	2	2,11		41,19	
19	2	2,5	2	2,13	2,05 ± 0,07	42,57	42,39±1,87
20	2	2,5	2	1,99		40,44	
21	2	2,5	2	2,02		44,16	
22	2	3,5	2	2,00	2,00 ± 0,00	42,94	44,17±1,21
23	2	3,5	2	2,00		45,36	
24	2	3,5	2	2,00		44,21	
25	4	0,5	2	2,31	2,31 ± 0,01	45,28	44,88±1,66
26	4	0,5	2	2,31		46,30	
27	4	0,5	2	2,30		43,06	
28	4	1,5	2	2,33	2,27 ± 0,13	43,40	44,12±0,81
29	4	1,5	2	2,12		44,99	
30	4	1,5	2	2,35		43,96	
31	4	2,5	2	2,08	2,05 ± 0,06	45,90	45,80±0,86
32	4	2,5	2	2,08		46,61	
33	4	2,5	2	1,98		44,90	
34	4	3,5	2	1,93	1,89 ± 0,17	46,13	45,49±1,08
35	4	3,5	2	1,70		44,24	
36	4	3,5	2	2,04		46,09	
37	6	0,5	2	2,01	1,85 ± 0,14	39,29	41,00±2,74
38	6	0,5	2	1,77		44,16	
39	6	0,5	2	1,77		39,56	

40	6	1,5	2	1,91	1,98 ± 0,08	44,54	43,45±1,97
41	6	1,5	2	1,95		44,64	
42	6	1,5	2	2,07		41,18	
43	6	2,5	2	1,99	2,00 ± 0,11	42,71	43,01±0,57
44	6	2,5	2	2,11		42,66	
45	6	2,5	2	1,89		43,67	
46	6	3,5	2	1,84	1,86 ± 0,02	42,69	42,54±0,89
47	6	3,5	2	1,88		41,58	
48	6	3,5	2	1,85		43,34	
49	8	0,5	2	2,15	1,99 ± 0,14	42,94	41,93±1,10
50	8	0,5	2	1,94		40,76	
51	8	0,5	2	1,89		42,10	
52	8	1,5	2	1,95	1,98 ± 0,03	42,54	42,49±0,46
53	8	1,5	2	2,01		42,92	
54	8	1,5	2	1,98		42,01	
55	8	2,5	2	2,06	1,99 ± 0,09	45	44,78±1,47
56	8	2,5	2	2,01		43,22	
57	8	2,5	2	1,89		46,13	
58	8	3,5	2	2,11	2,00 ± 0,10	41,21	42,19±0,95
59	8	3,5	2	1,98		43,11	
60	8	3,5	2	1,91		42,25	
61	6	3,5	1,5	1,98	2,00 ± 0,03	42,71	43,37±0,70
62	6	3,5	1,5	1,99		44,10	
63	6	3,5	1,5	2,03		43,29	
64	6	3,5	2,5	1,94	1,89 ± 0,10	43,11	43,06±1,00
65	6	3,5	2,5	1,96		42,04	
66	6	3,5	2,5	1,78		44,03	
67	6	3,5	3	2,06	1,92 ± 0,25	45,1	44,25±0,81
68	6	3,5	3	2,07		43,5	
69	6	3,5	3	1,64		44,14	
70	4	2	2,25	1,99	2,00 ± 0,01	43,48	44,17±2,55
71	4	2	2,25	2,00		42,04	
72	4	2	2,25	2,00		47	

Anexo 2 - Resultados Estatísticos (Optimização do processo de extracção)

Os cálculos estatísticos relativos à optimização do processo de extracção foram efectuados no software SAS (*Statistical Analysis Software*) e no Excel.

Resultados da aplicação da correlação de Pearson

No que concerne ao estudo da correlação entre as variáveis dependentes (Pearson) os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela B2.

Os valores médios obtidos de cada 3 replicados em cada extracção representam um ponto na análise da correlação de Pearson. Assim temos um número total de 24 tratamentos, cujo correspondente número de graus de liberdade é $24-2=22$.

Tabela A2 – Valores críticos do coeficiente de Pearson (r) para diferentes níveis de significância para GL=22.

nível de significância (α)	0,1	0,05	0,02	0,01
valor de r	0,344	0,404	0,472	0,515

Tabela B2 – Valores do coeficiente de Pearson (r) para o estudo da dependência das variáveis.

	Rendimento (%)	Força do gel (g cm^{-2})	Tg ($^{\circ}\text{C}$)	Tf ($^{\circ}\text{C}$)	Sulfato (% w/w)	3,6-AG (%w/w)
Rendimento		0,472075	0,722531	0,501749	-0,692630	0,748766
Força do gel			0,881498	0,950492	-0,599074	0,801973
Tg				0,940168	-0,782966	0,925769
Tf					-0,663080	0,841608
Sulfato						-0,660340
3,6-AG						

Tomando como nível de significância 0,05, o valor crítico do coeficiente de Pearson será igual a 0,404, Tabela A5, e comparando este valor com os restantes r 's calculados podemos inferir sobre a dependência entre as variáveis em estudo.

Resultados dos testes ANOVA e agrupamentos de Duncan

Os ficheiros SAS com os resultados referentes aos testes ANOVA realizados (1 e 2 factores) e de Duncan encontram-se descritos a seguir:

Analysis of Variance Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
CONC	5	0 2 4 6 8
PRETIME	4	0.5 1.5 2.5 3.5

Number of observations in data set = 60

The SAS System			18:30 Tuesday, May 13, 1997 15		
Analysis of Variance Procedure					
Dependent Variable: YIELD					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	2004.62916667	105.50679825	28.28	0.0001
Error	40	149.20833333	3.73020833		
Corrected Total	59	2153.83750000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	YIELD Mean	
	0.930724	7.421229	1.93137473	26.02500000	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CONC	4	1773.45208333	443.36302083	118.86	0.0001
PRETIME	3	91.53750000	30.51250000	8.18	0.0002
CONC*PRETIME	12	139.63958333	11.63663194	3.12	0.0034

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: GELSTR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	2485335.30971773	130807.12156409	27.17	0.0001
Error	40	192556.30436613	4813.90760915		
Corrected Total	59	2677891.61408385			
	R-Square	C.V.	Root MSE		GELSTR Mean
	0.928094	19.52583	69.38232923		355.33612734

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CONC	4	1417969.02525165	354492.25631291	73.64	0.0001
PRETIME	3	457525.29130155	152508.43043385	31.68	0.0001
CONC*PRETIME	12	609840.99316452	50820.08276371	10.56	0.0001

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: GELTEMP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	1265.25066667	66.59214035	35.31	0.0001
Error	40	75.44666667	1.88616667		
Corrected Total	59	1340.69733333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	GELTEMP Mean	
	0.943726	4.279324	1.37337783	32.09333333	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CONC	4	1044.98566667	261.24641667	138.51	0.0001
PRETIME	3	48.54266667	16.18088889	8.58	0.0002
CONC*PRETIME	12	171.72233333	14.31019444	7.59	0.0001

The SAS System			18:30 Tuesday, May 13, 1997 21		
Analysis of Variance Procedure					
Dependent Variable: MELTEMP					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	1674.04316667	88.10753509	10.51	0.0001
Error	40	335.17333333	8.37933333		
Corrected Total	59	2009.21650000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	MELTEMP Mean	
	0.833182	3.910975	2.89470781	74.01500000	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CONC	4	1055.08900000	263.77225000	31.48	0.0001
PRETIME	3	205.24316667	68.41438889	8.16	0.0002
CONC*PRETIME	12	413.71100000	34.47591667	4.11	0.0003

The SAS System

18:30 Tuesday, May 13, 1997 22

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: SULFATE

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	1.63794000	0.08620737	8.10	0.0001
Error	40	0.42593333	0.01064833		
Corrected Total	59	2.06387333			
	R-Square	C.V.	Root MSE	SULFATE Mean	
	0.793624	4.955535	0.10319076	2.08233333	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CONC	4	1.16285667	0.29071417	27.30	0.0001
PRETIME	3	0.11880667	0.03960222	3.72	0.0189
CONC*PRETIME	12	0.35627667	0.02968972	2.79	0.0074

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: YIELD

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 3.730208

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	1.594	1.676	1.729	1.768

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	CONC
	A	29.9583	12	6
	A			
B	A	29.1667	12	2
B				
B		27.9792	12	8
B				
B		27.7500	12	4
	C	15.2708	12	0

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: GELSTR

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 4813.908

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	57.25	60.19	62.12	63.51

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CONC
A	514.70	12	6
B	444.42	12	4
B			
B	429.66	12	8
C	310.61	12	2
D	77.29	12	0

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: GELTEMP

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 1.886167

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	1.133	1.191	1.230	1.257

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CONC
A	35.0333	12	6
A			
A	35.0000	12	8
A			
A	34.5667	12	4
B	31.7583	12	2
C	24.1083	12	0

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: MELTEMP

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 8.379333

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	2.388	2.511	2.592	2.650

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CONC
A	77.308	12	4
A			
A	77.150	12	8
A			
A	77.050	12	6
B	71.858	12	2
C	66.708	12	0

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: SULFATE

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 0.010648

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	.08514	.08952	.09239	.09446

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	CONC
	A	2.32500	12	0
	B	2.12750	12	4
	B			
C	B	2.04917	12	2
C				
C	D	1.99000	12	8
	D			
	D	1.92000	12	6

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: YIELD

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 3.730208

Number of Means	2	3	4
Critical Range	1.425	1.499	1.547

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	PRETIME
A	27.9000	15	0.5
B	26.3500	15	1.5
B			
C B	25.1000	15	3.5
C			
C	24.7500	15	2.5

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: GELSTR

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 4813.908

Number of Means	2	3	4
Critical Range	51.20	53.84	55.56

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	PRETIME
	A	440.37	15	3.5
	A			
B	A	402.66	15	2.5
B				
B		367.50	15	1.5
	C	210.82	15	0.5

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: GELTEMP

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 1.886167

Number of Means	2	3	4
Critical Range	1.014	1.066	1.100

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	PRETIME
A	32.7800	15	3.5
A			
A	32.5600	15	1.5
A			
A	32.4867	15	2.5
B	30.5467	15	0.5

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: MELTEMP

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 8.379333

Number of Means	2	3	4
Critical Range	2.136	2.246	2.318

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	PRETIME
A	76.127	15	3.5
A			
A	74.653	15	2.5
A			
A	74.227	15	1.5
B	71.053	15	0.5

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: SULFATE

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 0.010648

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.07615	.08007	.08264

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	PRETIME
A	2.13067	15	1.5
A			
A	2.10000	15	2.5
A			
A	2.08867	15	0.5
B	2.01000	15	3.5

Analysis of Variance Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
CONC	5	0 2 4 6 8
PRETREAT	4	0.5 1.5 2.5 3.5

Number of observations in data set = 60

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: AG

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	1472.50330667	77.50017404	32.29	0.0001
Error	40	95.99586667	2.39989667		
Corrected Total	59	1568.49917333			
	R-Square	C.V.	Root MSE		AG Mean
	0.938798	3.812910	1.54915999		40.62933333

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CONC	4	1328.28559000	332.07139750	138.37	0.0001
PRETREAT	3	38.76569333	12.92189778	5.38	0.0033
CONC*PRETREAT	12	105.45202333	8.78766861	3.66	0.0010

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: AG

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 2.399897

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	1.278	1.344	1.387	1.418

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CONC
A	45.0717	12	4
B	42.8492	12	8
B			
B	42.5017	12	6
C	41.1633	12	2
D	31.5608	12	0

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: AG

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 40 MSE= 2.399897

Number of Means	2	3	4
Critical Range	1.143	1.202	1.241

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	PRETREAT
A	41.4727	15	2.5
A			
A	40.9180	15	1.5
A			
A	40.8213	15	3.5
B	39.3053	15	0.5

Analysis of Variance Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
EXTIME	4	2 3 1.5 2.5

Number of observations in data set = 12

The SAS System			18:30 Tuesday, May 13, 1997 40		
Analysis of Variance Procedure					
Dependent Variable: YIELD					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	46.37340000	15.45780000	10.94	0.0033
Error	8	11.29906667	1.41238333		
Corrected Total	11	57.67246667			
	R-Square	C.V.	Root MSE	YIELD Mean	
	0.804082	4.521065	1.18843735	26.28666667	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EXTIME	3	46.37340000	15.45780000	10.94	0.0033

The SAS System

18:30 Tuesday, May 13, 1997 41

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: GELSTR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	149015.00026667	49671.66675556	5.76	0.0214
Error	8	69035.34440000	8629.41805000		
Corrected Total	11	218050.34466667			
	R-Square	C.V.	Root MSE	GELSTR Mean	
	0.683397	18.06820	92.89466104	514.13333333	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EXTIME	3	149015.00026667	49671.66675556	5.76	0.0214

The SAS System			18:30 Tuesday, May 13, 1997 45		
Analysis of Variance Procedure					
Dependent Variable: GELTEMP					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	1.79333333	0.59777778	0.93	0.4699
Error	8	5.14666667	0.64333333		
Corrected Total	11	6.94000000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	GELTEMP Mean	
	0.258405	2.240449	0.80208063	35.80000000	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EXTIME	3	1.79333333	0.59777778	0.93	0.4699

The SAS System			18:30 Tuesday, May 13, 1997 46		
Analysis of Variance Procedure					
Dependent Variable: MELTEMP					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	20.67583333	6.89194444	2.00	0.1934
Error	8	27.63333333	3.45416667		
Corrected Total	11	48.30916667			
	R-Square	C.V.	Root MSE	MELTEMP Mean	
	0.427990	2.370837	1.85853885	78.39166667	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EXTIME	3	20.67583333	6.89194444	2.00	0.1934

The SAS System			18:30 Tuesday, May 13, 1997 47		
Analysis of Variance Procedure					
Dependent Variable: SULFATE					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.03336667	0.01112222	0.63	0.6183
Error	8	0.14220000	0.01777500		
Corrected Total	11	0.17556667			
	R-Square	C.V.	Root MSE	SULFATE Mean	
	0.190051	6.949935	0.13332292	1.91833333	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EXTIME	3	0.03336667	0.01112222	0.63	0.6183

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: YIELD

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 1.412383

Number of Means	2	3	4
Critical Range	2.238	2.332	2.384

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	EXTIME
A	29.4167	3	2
B	26.5000	3	3
B			
B	24.7300	3	1.5
B			
B	24.5000	3	2.5

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: GELSTR

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 8629.418

Number of Means	2	3	4
Critical Range	174.9	182.3	186.4

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	EXTIME
A	635.97	3	1.5
A			
A	614.25	3	2
B	412.44	3	2.5
B			
B	393.87	3	3

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: GELTEMP

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 0.643333

Number of Means	2	3	4
Critical Range	1.510	1.574	1.609

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	EXTIME
A	36.2333	3	2.5
A			
A	36.1333	3	1.5
A			
A	35.4667	3	3
A			
A	35.3667	3	2

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: MELTEMP

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 3.454167

Number of Means	2	3	4
Critical Range	3.499	3.647	3.729

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	EXTIME
A	79.700	3	1.5
A			
A	79.100	3	2
A			
A	78.533	3	2.5
A			
A	76.233	3	3

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: SULFATE

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 0.017775

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.2510	.2616	.2675

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	EXTIME
A	2.0000	3	1.5
A			
A	1.9233	3	3
A			
A	1.8933	3	2.5
A			
A	1.8567	3	2

Analysis of Variance Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
EXTTIME	4	2 3 1.5 2.5

Number of observations in data set = 12

The SAS System			22:14 Friday, May 23, 1997			6
Analysis of Variance Procedure						
Dependent Variable: AG						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	4.62262500	1.54087500	2.11	0.1771	
Error	8	5.83980000	0.72997500			
Corrected Total	11	10.46242500				
	R-Square	C.V.	Root MSE		AG Mean	
	0.441831	1.973063	0.85438574		43.30250000	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
EXTTIME	3	4.62262500	1.54087500	2.11	0.1771	

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: AG

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 8 MSE= 0.729975

Number of Means	2	3	4
Critical Range	1.609	1.676	1.714

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	EXTTIME
A	44.2467	3	3
A			
A	43.3667	3	1.5
A			
A	43.0600	3	2.5
A			
A	42.5367	3	2

Anexo 3 - Resultados Estatísticos (Biossorção de metais pesados)

Os resultados experimentais dos ensaios em adsorvedor foram ajustados aos modelos cinéticos e de equilíbrio por regressão não linear usando o programa Fig P 2.5 da Biosoft. Este software permite obter os valores dos parâmetros do ajuste, os respectivos desvios e ainda o coeficiente de correlação e a variância residual.

Para comparar a qualidade dos ajustes dos dois modelos cinéticos aos resultados experimentais usou-se o Teste-F. O parâmetro F é calculado como o quociente das variâncias dos dois modelos em comparação:

$$F_{calculado} = \frac{S_{R(A)}^2}{S_{R(B)}^2}$$

em que, $S_{R(A)}^2$ e $S_{R(B)}^2$ são as variâncias residuais dos modelos A e B, respectivamente. Geralmente a variância do modelo que produz o melhor ajuste é colocada no denominador. O Teste-F permite saber se um dado modelo é mais preciso que outro e, por outro lado, se existe uma diferença estatisticamente significativa na precisão dos dois modelos, comparando os valores de $F_{calculado}$ com os valores tabelados de F crítico $F(1 - \alpha)$, para um dado grau de confiança (neste caso, $(1 - \alpha) = 95\%$), e tendo em conta os graus de liberdade do sistema (n-1, com n= número de pontos experimentais).

Se $F_{calculado} < F_{1-\alpha}$, não existe diferença estatística entre os dois modelos, para um grau de confiança $(1-\alpha)$.

Para os modelos cinéticos vem,

$$F_{calculado} = \frac{S_{R(pseudo-primeira)}^2}{S_{R(pseudo-segunda)}^2} = \frac{0,77}{0,24} = 3,21$$

Pela consulta de uma tabela relativa aos valores críticos de F, para 13 GL e $(1 - \alpha) = 95\%$,

$$F_{teórico} = 2,56 < F_{calculado}$$

Logo, o modelo que dá o melhor ajuste é o modelo cuja variância residual foi colocada em denominador, ou seja, o modelo de pseudo-segunda ordem.

