

**LETÍCIA RUSTICI CHICA**

**Aplicação de ultrassom e avaliação da qualidade de alginato de  
sódio de *Sargassum* spp.**

**ASSIS**

**2020**

**LETÍCIA RUSTICI CHICA**

**Aplicação de ultrassom e avaliação da qualidade de alginato de sódio de *Sargassum* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador(a): Ivanise Guilherme Branco

**ASSIS**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Vânia Aparecida Marques Favato - CRB 8/3301

C532a Chica, Letícia Rustici  
Aplicação de ultrassom e avaliação da qualidade de alginato de sódio de *Sargassum* spp / Letícia Rustici Chica.  
Assis, 2020.  
46 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis  
Orientadora: Dra. Ivanise Guilherme Branco

1. Algas marinhas. 2. Alginatos. 3. Ultrassom. 4. Ácido cítrico. I. Título.

CDD 586



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Assis



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Aplicação de ultrassom e avaliação da qualidade de alginato de sódio de *Sargassum* spp.

**AUTORA:** LETÍCIA RUSTICI CHICA

**ORIENTADORA:** IVANISE GUILHERME BRANCO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS, área:  
Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. IVANISE GUILHERME BRANCO  
Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/Assis

Profa. Dra. CASSIA ROBERTA MALACRIDA MAYER  
Departamento de Biotecnologia / UNESP/Assis

Profa. Dra. BRUNA ESCARAMBONI  
IPBEN / UNESP/Rio Claro

Assis, 27 de março de 2020

Dedico este trabalho aos meus grandes  
companheiros, Laura e Odin.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Ivanise, por todo o tempo que dedicou a me ajudar durante o processo de realização deste trabalho.

Aos professores Ciro, Cássia e Izabel pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

Aos colaboradores técnico-administrativos Allan, Giba e Sérgio que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Aos companheiros de laboratório Camila, Henrique e Laura pela ajuda e companheirismo.

À minha família que me ajudou financeiramente nesse período.

À minha companheira de vida Laura que sempre me apoia e acredita em mim.

Ao meu cãopanheiro Odin por toda alegria e risadas que me proporciona.

Aos meus amigos, Andressa, Ana Paula e Gabriel por torcerem por mim e estarem sempre ao meu lado.

A todos os seres metafísicos aos quais precisei recorrer algumas vezes durante esses dois anos.

E, enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, registro aqui meus mais sinceros agradecimentos.

“Você tem que agir como se fosse possível transformar radicalmente o mundo. E você tem que fazer isso o tempo todo”. (Angela Davis)

“É necessário se espantar, se indignar e se contagiar, só assim é possível mudar a realidade”. (Nise da Silveira)

CHICA, Letícia Rustici. **Aplicação de ultrassom e avaliação da qualidade de alginato de sódio de *Sargassum* spp.**. 2020. 46 f. Dissertação (Mestrado acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2020.

## RESUMO

As algas marinhas marrons possuem diversos biocompostos de interesse econômico. Dentre eles, o alginato é um composto que apresenta aplicação em diferentes setores industriais devido a suas propriedades espessantes. Apesar de sua grande aplicabilidade, praticamente todo alginato utilizado no Brasil é importado. Desse modo, é de suma importância incentivar a produção nacional desse polissacarídeo, visto que a alga *Sargassum* está presente em abundância no litoral brasileiro. No presente estudo, foi utilizado o delineamento Box-Behnken para otimizar a etapa de extração do alginato com aplicação de ultrassom, em substituição parcial à etapa ácida tradicionalmente aplicada no processo, a qual normalmente utiliza ácido clorídrico, pelo ácido cítrico, que é um ácido mais fraco e ecológico. Foram obtidas 17 combinações a fim de avaliar o efeito de três fatores, potência do ultrassom, pH e tempo de aplicação do ultrassom, sobre o rendimento, capacidade antioxidante, viscosidade dinâmica, viscosidade intrínseca e peso molecular. A condição otimizada (176 W, pH 1, 15 minutos) gerou rendimento de 54,20%, capacidade antioxidante de 80,81  $\mu\text{M}$  trolox/g de alginato, viscosidade intrínseca de 4,28 dL/g e peso molecular de 202,56 kDa. Dentre os parâmetros estudados, o pH apresentou maior influência sobre as respostas estudadas. Na condição otimizada, foi avaliado o efeito do emprego do ácido clorídrico no rendimento e parâmetros de qualidade do alginato. Os resultados mostraram maiores rendimento e capacidade antioxidante na extração com ácido cítrico, e valores próximos de viscosidade intrínseca e peso molecular do alginato extraído com os dois ácidos, mostrando que o ácido cítrico é uma alternativa interessante na substituição do ácido clorídrico, quando combinado com ultrassom. Assim, a aplicação de ultrassom é um método promissor para a extração de alginato de sódio, podendo o ácido cítrico ser satisfatoriamente empregado na etapa ácida.

**Palavras-chave:** Algas marinhas. Alginatos. Ultrassom. Box-Behnken. Ácido cítrico.



CHICA, Letícia Rustici. **Ultrasound application and evaluation of the quality of sodium alginate from *Sargassum* spp.**. 2020. 46 f. Dissertation (Masters in Biosciences). – Sao Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2020.

## ABSTRACT

Brown algae have several bio composites of economic interest. Among them is the alginate, a compound that, due to its thickening properties, has application in different industrial sectors. Despite its great applicability, all alginate used in Brazil is imported. Thus, it is extremely important to encourage the national production of this polysaccharide, since the *Sargassum* seaweed is present in abundance on the Brazilian coast. In the present study, the Box-Behnken design was used to optimize the alginate extraction with the application of ultrasound, partially replacing the acidic treatment with hydrochloric acid, with citric acid applied in the extraction process by an acidic treatment with citric acid, which is a weaker and more ecological option. 17 combinations were obtained in order to evaluate the effect of 3 factor, ultrasound potency, citric acid pH and ultrasound application time, on the yield, antioxidant capacity, dynamic viscosity, intrinsic viscosity and molecular weight. The optimized condition (176 W, pH 1, 15 minutes) resulted in a yield of 54.20%, antioxidant capacity of 80.81  $\mu$ M trolox/g of alginate, intrinsic viscosity of 4.28 dL/g and molecular weight of 202.56 kDa. From the studied parameters, it was observed that the pH had a greater influence on the responses. In the optimized condition, the effect of the hydrochloric acid on alginate yield and quality parameters was evaluated. The extraction with citric acid showed higher yield and antioxidant capacity with close values of intrinsic viscosity and molecular weight to the alginate extracted with hydrochloric acid. This shows that citric acid is an interesting alternative in the replacement of hydrochloric acid, when combined with ultrasound. The results showed that the application of ultrasound is a promising method for the extraction of sodium alginate and that the acidic treatment can be satisfactorily replaced with citric acid.

**Palavras-chave:** Seaweeds. Alginates. Ultrasound. Box-Behnken. Citric acid.

## SUMÁRIO

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                  | <b>12</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                    | <b>14</b> |
| <b>2.1 Objetivo geral .....</b>                                            | <b>14</b> |
| <b>2.2 Objetivos específicos.....</b>                                      | <b>14</b> |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                        | <b>14</b> |
| <b>3.1 Algas.....</b>                                                      | <b>14</b> |
| <b>3.2 Alginato .....</b>                                                  | <b>16</b> |
| <b>3.3 Ultrassom.....</b>                                                  | <b>17</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                         | <b>18</b> |
| <b>4.1 Processamento e secagem das algas .....</b>                         | <b>18</b> |
| <b>4.2 Delineamento experimental.....</b>                                  | <b>19</b> |
| <b>4.3 Extração do alginato .....</b>                                      | <b>21</b> |
| 4.3.1 Pré-tratamento com álcool .....                                      | 21        |
| 4.3.2 Tratamento ácido .....                                               | 21        |
| 4.3.3 Tratamento alcalino .....                                            | 22        |
| 4.3.4 Precipitação do alginato de sódio.....                               | 22        |
| <b>4.4 Rendimento.....</b>                                                 | <b>22</b> |
| <b>4.5 Determinação da capacidade antioxidante pelo radical ABTS .....</b> | <b>22</b> |
| <b>4.6 Comportamento reológico.....</b>                                    | <b>23</b> |
| <b>4.7 Viscosidade intrínseca e peso molecular .....</b>                   | <b>23</b> |
| <b>4.8 Validação do delineamento .....</b>                                 | <b>24</b> |

|                                                                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                               | <b>25</b> |
| <b>5.1 Ajuste do modelo e análises estatísticas.....</b>                                                                                            | <b>25</b> |
| <b>5.2 Efeito das variáveis de extração sobre o rendimento do alginato de sódio.....</b>                                                            | <b>29</b> |
| <b>5.3 Efeito das variáveis de extração sobre a capacidade antioxidante do alginato de sódio.....</b>                                               | <b>30</b> |
| <b>5.4 Efeito das variáveis de extração sobre a viscosidade dinâmica do alginato de sódio.....</b>                                                  | <b>32</b> |
| <b>5.5 Efeito das variáveis de extração sobre a viscosidade intrínseca e o peso molecular do alginato de sódio .....</b>                            | <b>34</b> |
| <b>5.6 Otimização e validação do delineamento.....</b>                                                                                              | <b>36</b> |
| <b>5.7 Avaliação da substituição do tipo de ácido, na condição otimizada, sobre o rendimento e os parâmetros de qualidade do alginato de sódio.</b> | <b>37</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                            | <b>38</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                           | <b>39</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As algas marinhas são consideradas importantes organismos fotossintéticos para o planeta. Estes organismos representam uma fonte significativa de biocompostos. Alguns compostos bioativos dessas algas são polissacarídeos solúveis como alginatos e carragenas, polissacarídeos sulfatados como fucoidan, carotenoides, ácidos graxos poliinsaturados como ômega-3, vitaminas, tocoferóis e ficocianinas (KADAM & PRABHASANKAR, 2010).

Por serem organismos que estão intensamente expostos às condições ambientais, à alta luminosidade e às concentrações consideráveis de oxigênio e gás carbônico, as algas desenvolveram mecanismos de defesa contra radicais livres, sendo, dessa forma, uma fonte importante de antioxidantes naturais (ROCHA *et al.*, 2007; FLEITA *et al.*, 2015).

As algas do gênero *Sargassum* spp. possuem diversos biocompostos que vêm sendo estudados para aplicação industrial. Dentre eles, o alginato é um dos que possuem grande interesse econômico, pois é amplamente utilizado em vários setores industriais (HAHN *et al.*, 2011).

O alginato de sódio é um polissacarídeo hidrossolúvel capaz de formar soluções de alta viscosidade. Pode ser utilizado como estabilizador de suspensões e espessante na indústria de alimentos (SIME, 1990). Outra propriedade importante das soluções de alginato de sódio é sua capacidade de formar géis na presença de cátions divalentes como o  $\text{Ca}^{2+}$  (DRAGET *et al.*, 1997). Todas essas características fazem com que esse biopolímero seja altamente requisitado em vários setores industriais como farmacêutico, cosmético, alimentício, têxtil e de papel (MÜLLER, 2011).

Apesar do grande número de aplicações, o Brasil importa toda a demanda de alginato utilizada nos diferentes segmentos industriais (MAFRA JR & CUNHA, 2002). Em 2017, o Brasil importou do Chile, China, Noruega e Itália, aproximadamente, \$10,8 milhões de dólares de ácido algínico (ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY, 2019). Essa dependência poderia ser reduzida através da produção nacional do alginato a partir da alga *Sargassum* spp., visto que está presente em abundância na costa marítima brasileira (DE OLIVEIRA, 2002).

Geralmente, os processos de extração e precipitação do alginato são baseados na conversão dos seus sais da forma insolúvel para a solúvel. A

conversão de alginato insolúvel em ácido algínico ocorre no pré-tratamento ácido, etapa esta realizada na extração convencional, comumente utilizando ácido clorídrico, a qual também contribui para o aumento do rendimento e remoção de alguns contaminantes como fucoidans, laminarinas, aminoácidos e polifenóis (HAHN *et al.*, 2011). A adição de carbonato de sódio à solução, em tempo e temperatura controlados, possibilitará a precipitação do alginato de sódio na sua forma solúvel (CALUMPONG *et al.*, 1999; PÉREZ *et al.*, 1992; ANDRIAMANANTOANINA *et al.*, 2010; McHUGH *et al.*, 1987; GOMEZ *et al.*, 2009).

Embora na maioria dos estudos o tratamento ácido seja realizado com ácidos fortes, como ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, FLÓREZ-FERNÁNDEZ *et al.* (2019) substituiu esses ácidos por ácido cítrico, um ácido orgânico fraco considerado ecológico, uma vez que não polui o meio ambiente.

Atualmente, vêm crescendo o desenvolvimento e aplicação de métodos sustentáveis e ecológicos visando a melhoria dos processos de extrações. Dentre esses, encontra-se o ultrassom que vem sendo utilizado a fim de reduzir o consumo de energia, o consumo de solventes, diminuindo, dessa forma, o tempo e o custo do processo (CHEMAT *et al.*, 2017).

A eficiência do ultrassom para extrair compostos fenólicos e óleos essenciais já foi demonstrada e apresentou melhores resultados quando comparada com os processos convencionais (KHAN *et al.*, 2010; TEKIN *et al.*, 2015; WONG *et al.*, 2015).

Os benefícios de utilizar ultrassom em extração sólido-líquido são o aumento do rendimento da extração e cinética rápida. Além disso, o ultrassom facilita a extração de compostos termossensíveis (KADAM, 2013). Em estudos voltados para a flora marinha, Youssouf *et al.* (2017) utilizaram extração por ultrassom para otimizar o rendimento de alginatos e carragenas extraídas de algas marrons e vermelhas, respectivamente. Kadam *et al.* (2015b), com a utilização de ultrassom, extraíram fenóis totais, fucose e ácido úrico de alga *Ascophyllum nodosum*. No entanto, ainda há necessidade de maiores estudos sobre a aplicação do ultrassom na extração de compostos provenientes de fontes marinhas.

Portanto, o objetivo geral desse trabalho foi otimizar a aplicação de ultrassom durante a etapa ácida da extração de alginato de sódio a partir da alga *Sargassum* spp. e avaliar a qualidade do alginato de sódio extraído.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral foi avaliar o efeito da aplicação do ultrassom e pH do meio de extração, utilizando ácido cítrico como substituto do ácido clorídrico, e avaliar a qualidade do polissacarídeo extraído.

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Estudar a influência da potência e tempo de aplicação do ultrassom, assim como o pH da etapa de tratamento ácido, pela substituição do ácido clorídrico pelo ácido cítrico, sobre o rendimento e os parâmetros de qualidade do polissacarídeo (capacidade antioxidante, caracterização reológica, viscosidade intrínseca e peso molecular).
- Encontrar a condição otimizada do processo e validação do delineamento.
- Comparar o efeito do ácido clorídrico com o do ácido cítrico, a partir da extração do polissacarídeo na condição otimizada, sobre rendimento, capacidade antioxidante, viscosidade intrínseca e peso molecular.

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Algas**

As algas marrons do gênero *Sargassum* spp. são amplamente distribuídas ao longo de áreas costeiras, nas regiões tropicais e subtropicais (PRINCE & O'NEAL, 1979). Estima-se que, somente no litoral brasileiro, podem ser encontradas em torno de 17 espécies (DE OLIVEIRA, 2002).

Este gênero de macroalgas pertence à família Sargassaceae que possui aspecto flutuante, sendo bastante representativo dentro da ordem Fucales (ALGAEBASE, 2012). Estas algas são estruturalmente formadas por um apressório, eixos principais de onde saem os ramos laterais, os quais constituem a maior parte do talo. Seus ramos finais são laminares e assemelham-se a uma nervura central, denominados porções laminares. Algumas espécies possuem cavidades com poros e vesículas flutuadoras chamadas de aerocistos (COIMBRA, 2006).



Figura 1. *Sargassum* sp. (Widayati & Rochmah dan Zubedi, 2009)

Ecologicamente, as algas *Sargassum* spp. possuem um papel importante como biofiltradores, sendo capazes de acumular metais pesados tóxicos. Além disso, são consideradas bioindicadores devido a sua sensibilidade às alterações da qualidade do mar (MURUGADAS *et al.*, 1995). Economicamente, algumas espécies podem ser utilizadas secas ou pulverizadas em preparações culinárias (WANG, 2008).

As algas marrons do gênero *Sargassum* spp. possuem diversos biocompostos com aplicação industrial. Um dos mais estudados é o polissacarídeo alginato, pois é amplamente utilizado em diferentes setores industriais.

Embora a biossíntese de carboidratos em algas marinhas seja similar à de plantas, alguns polissacarídeos só podem ser encontrados nas algas. Estes biopolímeros estão presentes principalmente nas paredes celulares, proporcionando resistência mecânica e flexibilidade para que elas suportem as correntes marinhas. Dessa forma, os polissacarídeos mais encontrados em algas marinhas são aqueles que possuem propriedades para formar géis e mucilagem (SHARMA & GUPTA, 2002; SIMEONE *et al.*, 2004).

Há três grupos principais de algas marinhas que são classificados de acordo com suas cores: marrom, vermelha e verde. Cada grupo possui a predominância de um polissacarídeo típico, o alginato é o mais abundante nas algas marinhas marrons (PERCIVAL & McDOWELL, 1990). Embora sua principal fonte atualmente seja as algas marrons, também pode ser produzido por bactérias (HAUGAN, 1994).

### 3.2 Alginato

O alginato faz parte da parede celular como uma mistura de sais de cálcio, potássio e sódio de ácido algínico (SIME, 1990). Eles constituem uma família de polissacarídeos que formam copolímeros lineares constituídos de ácidos  $\alpha$ -L-gulurônicos (G) e  $\beta$ -D-manurônicos (M) com ligações 1-4 (Figura 1). A proporção entre os resíduos (G,M), a estrutura sequencial e o grau de polimerização variam extensamente dependendo da fonte de extração, das condições de crescimento e estacionárias (SKJAK-BRAEK *et al.*, 1986).

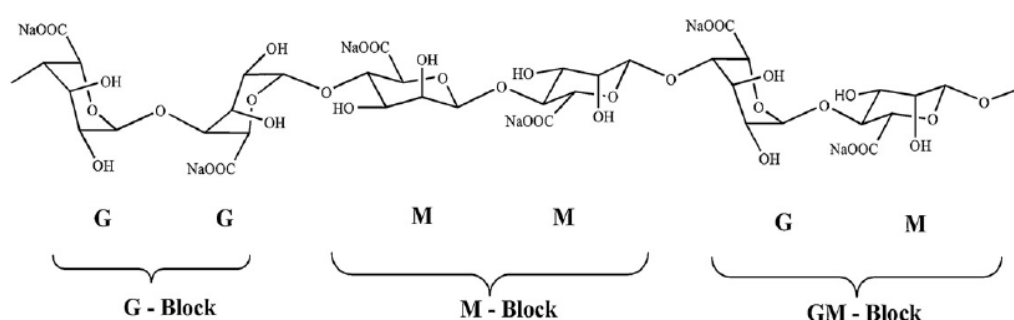


Figura 2. Estrutura molecular do alginato de sódio.

Foi demonstrado que as propriedades físicas do alginato dependem não apenas da composição de ácido urônico, mas também da sequência em que os resíduos se apresentam na cadeia, podendo alterar significativamente as diferenças estruturais (INDEGAARD & SKJAK-BRAEK, 1987/1990).

A grande utilização do alginato ocorre devido a suas diversas propriedades como agente espessante, estabilizante de emulsões e de espuma, agente de formação de filmes e fibras sintéticas entre outras. Todas essas características conferem a esse biopolímero uma alta aplicação em diversos setores industriais como farmacêutico, cosmético, alimentício, têxtil e de papel (MÜLLER, 2011).

Atualmente, existe a necessidade de desenvolver novos métodos sustentáveis mais eficientes que minimizem a utilização de químicos e a emissão de gases do efeito estufa. Dentre esses métodos, encontra-se o ultrassom que é capaz de reduzir o tempo de processo, o consumo de energia e a utilização de químicos, diminuindo, dessa forma, o custo geral do processo (CHEMAT *et al.*, 2017).



### 3.3 Ultrassom

Ondas de ultrassom são ondas sonoras, ou seja, ondas mecânicas. Estas ondas propagam-se em uma frequência acima da capacidade auditiva humana, superior a 20 KHz. Os ultrassons podem ser classificados em dois grupos: de baixa intensidade e alta intensidade. Os de baixa intensidade são utilizados para estudar as propriedades físico-químicas de alimentos. Já os ultrassons de alta intensidade funcionam numa faixa de frequência de 20-100 KHz e são utilizados para a extração de compostos de interesse (GOGATE *et al.*, 2011).

As ondas de alta intensidade se propagam em ciclos de compressão e rarefação, ocorrendo a formação de zonas de alta e baixa pressão, criando bolhas. Essas bolhas sofrem um processo de colapso ou implosão que é conhecido como cavitação. A implosão das bolhas de cavitação gera macroturbulência, colisões interpartículas e perturbação nos microporos das partículas da biomassa, transformando as ondas sonoras em energia mecânica que quebra a célula e sua parede celular (LUQUE-GARCÍA & LUQUE DE CASTRO, 2003; SORIA & VILLAMIEL, 2010; SHIRSATH *et al.*, 2012; MEROUANI *et al.*, 2014).

Existem dois tipos principais de equipamentos ultrassônicos que podem ser utilizados para extração. O mais simples e barato é o banho ultrassônico, que opera numa frequência de 40-50 KHz e numa potência de 50-500 W. O outro equipamento é a sonda ultrassônica que opera numa frequência de 20 KHz e fornece uma energia acústica muito mais intensa do que os banhos ultrassônicos, pois a vibração mecânica gerada pelo transdutor é propagada por meio de sua ponteira (Figura 2), que fica em contato direto com a solução. Isto é, o tratamento com a sonda ultrassônica é mais intenso do que o tratamento com o banho ultrassônico (ASHOKKUMAR & MASON, 2007).

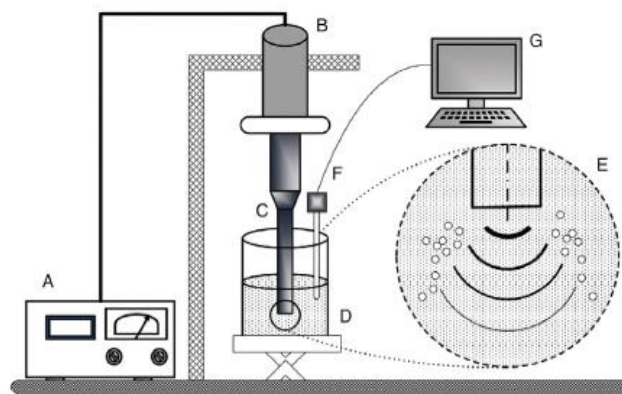


Figura 3. Sonda ultrassônica (Kadam *et al.* 2015a)

Adicionalmente, a sonda permite que alguns parâmetros sejam selecionados, como a amplitude. Já no banho não é possível variar a potência (ASHOKKUMAR & MASON, 2007). A vantagem das sondas é a possibilidade de ajustar os parâmetros relacionados com a cavitação, como amplitude, frequência e potência. As propriedades do meio também são importantes, como temperatura, tensão superficial, viscosidade e vapor de pressão (GOGATE *et al.*, 2003, 2011; SANTOS *et al.*, 2008). Ademais, a extração por ultrassom pode ser combinada a outras técnicas, como termossonicação (calor + sonicação), manossoonicação (pressão + sonicação), termomanossoonicação (calor + pressão + sonicação) (SORIA & VILLAMIEL, 2010).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Processamento e secagem das algas

As algas utilizadas foram coletadas na Praia Grande, em Ubatuba, litoral do Estado de São Paulo. Os materiais coletados foram acondicionados em frascos, mantidos com água do mar e transportados em material isolante térmico.

Imediatamente após a chegada no laboratório, as algas passaram por triagem, foram lavadas em água corrente e retiraram-se quaisquer organismos exógenos a elas. Em seguida, as algas foram sanitizadas com água clorada (25 ppm) durante 30 minutos, centrifugadas, em centrífuga doméstica, para retirar o excesso de água e secas em uma estufa com circulação de ar a 45°C. O material desidratado foi transformado em pó com um mixer, acondicionado em local seco e mantido em temperatura ambiente.

## 4.2 Delineamento experimental

A metodologia de superfície de resposta (RSM), utilizando o delineamento Box-Behnken (BBD), foi aplicada para otimizar a influência dos parâmetros do tratamento ácido utilizando ultrassom na extração de alginato de sódio. As variáveis independentes de tratamento foram potência ( $x_1$ ), pH do ácido cítrico ( $x_2$ ) e tempo ( $x_3$ ) de aplicação do ultrassom, enquanto as variáveis dependentes (respostas) foram rendimento, viscosidade intrínseca, peso molecular, caracterização reológica e capacidade antioxidante. A Tabela 1 apresenta o delineamento utilizado com cinco replicatas no ponto central, totalizando 17 ensaios experimentais. Os limites do tratamento ácido foram estabelecidos após verificação de alguns estudos que realizaram extração de alginato de algas pardas utilizando ultrassom (LORBEER *et al.*, 2015; YOUSSEF *et al.*, 2017; KADAM *et al.*, 2015; FLÓREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2019). As faixas das variáveis estudadas foram: pH de 1 a 3, tempos de tratamento de 5 a 15 minutos e potências de 120 a 280 Watts.

O software Design Expert 6 (StatEaseInc. Minneapolis, USA) foi utilizado para realizar as análises estatísticas de cada modelo. A significância estatística dos coeficientes da equação ( $P < 0,05$ ) foi determinada através da análise de variância (ANOVA) e a qualidade de ajuste do modelo polinomial aos dados experimentais foi fornecido através do coeficiente de correlação  $R^2$  e sua significância pelo teste F. O modelo é considerado aceitável quando atinge 95% de significância ( $P_S < 0,05$ ) e alto coeficiente de correlação ( $R^2 \geq 0,8$ ). Foi executado o teste para perfil de desejabilidade (“Desirability Profiles”) para que fosse encontrada a melhor condição de tratamento (LUNDSTEDT *et al.*, 1998; LORBEER *et al.*, 2015).

Tabela 1- Modelo do delineamento experimental, com as faixas de cada variável avaliada.

| Extração | Potência<br>do<br>Ultrassom<br>(%) | X <sub>1</sub> | pH | X <sub>2</sub> | Tempo<br>(min) | X <sub>3</sub> |
|----------|------------------------------------|----------------|----|----------------|----------------|----------------|
| 1        | 50                                 | 0              | 2  | 0              | 10             | 0              |
| 2        | 50                                 | 0              | 3  | 1              | 5              | -1             |
| 3        | 50                                 | 0              | 1  | -1             | 15             | 1              |
| 4        | 50                                 | 0              | 2  | 0              | 10             | 0              |
| 5        | 70                                 | 1              | 2  | 0              | 15             | 1              |
| 6        | 50                                 | 0              | 2  | 0              | 10             | 0              |
| 7        | 30                                 | -1             | 3  | 1              | 10             | 0              |
| 8        | 70                                 | 1              | 3  | 1              | 10             | 0              |
| 9        | 30                                 | -1             | 2  | 0              | 15             | 1              |
| 10       | 50                                 | 0              | 2  | 0              | 10             | 0              |
| 11       | 30                                 | -1             | 2  | 0              | 5              | -1             |
| 12       | 70                                 | 1              | 1  | -1             | 10             | 0              |
| 13       | 70                                 | 1              | 2  | 0              | 5              | -1             |
| 14       | 50                                 | 0              | 1  | -1             | 5              | -1             |
| 15       | 50                                 | 0              | 2  | 0              | 10             | 0              |
| 16       | 50                                 | 0              | 3  | 1              | 15             | 1              |
| 17       | 30                                 | -1             | 1  | -1             | 10             | 0              |

Potências: 30% = 120 W; 50% = 200 W; 70% = 280 W.

### 4.3 Extração do alginato



Figura 4. Fluxograma do processo de extração do alginato.

#### 4.3.1 Pré-tratamento com álcool

Alga seca e triturada (6 g) foi imersa em etanol 99% e mantida sob agitação em shaker por 3 horas e seca overnight em estufa a 40 °C. Esse processo foi repetido duas vezes, para retirada dos compostos fenólicos e proteínas.

#### 4.3.2 Tratamento ácido

Nesta etapa foi realizada a otimização do tratamento ácido com aplicação de ultrassom. A alga (6 g) pré-tratada com etanol 99% e seca foi submetida ao tratamento ácido. Inicialmente, em um béquer de vidro (250 ml) forma alta, foram adicionados água destilada e ácido cítrico monohidratado 20% com a alga até atingir o pH desejado (pH 1, 2 ou 3). Em seguida, a solução foi colocada em contato com uma sonda ultrassônica (OR-T-500, OMNI International™) sendo testados diferentes potências (30, 50 ou 70%) e tempos (5, 10 ou 15 min). A sonda utilizada possui ponteira (parte da sonda que fica em contato direto com a solução) de 12,7 mm de diâmetro e comprimento de 13,65 cm, recomendada para volumes entre 10 mL a

300 mL, tem frequência de 20 kHz e potência máxima de 400 W (referente a 100%). Após a aplicação do ultrassom, as amostras foram lavadas com água destilada e utilizadas na próxima etapa.

A mesma metodologia foi aplicada para a extração da condição otimizada utilizando o ácido clorídrico 1 N em substituição ao ácido cítrico.

#### 4.3.3 Tratamento alcalino

Ao material algal previamente sonificado e lavado foi adicionado água destilada e carbonato de sódio 1N até atingir pH 10 (NOGUEIRA, 2017). As amostras foram agitadas magneticamente durante 90 minutos a 80 °C e após, a solução foi filtrada repetidamente até separar a parte sólida da líquida. O filtrado foi reservado para a precipitação do alginato.

#### 4.3.4 Precipitação do alginato de sódio

Para a obtenção do alginato de sódio, adicionou-se álcool etílico absoluto (99%) ao filtrado na proporção 1:2 ( $V_{\text{solução}}/V_{\text{álcool}}$ ). Segundo Gomes *et al.* (2009), a extração do alginato com etanol melhora o rendimento e as propriedades reológicas do produto. O alginato de sódio precipitado foi separado com o auxílio de um bastão de vidro quando em grandes volumes ou por centrifugação quando em pequenos volumes. O alginato precipitado foi seco em estufa a 40 °C.

#### 4.4 Rendimento

O rendimento de alginato de sódio obtido de *Sargassum* foi calculado através da Equação 1.

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Matéria final seca do produto}}{\text{Matéria seca da alga antes da extração}} \times 100 \quad (1)$$

#### 4.5 Determinação da capacidade antioxidante pelo radical ABTS

A capacidade antioxidante dos alginatos foi avaliada utilizando o radical ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), segundo Rufino *et al.* (2007). O radical ABTS foi preparado a partir da reação da solução estoque ABTS (7 mM) com a solução de persulfato de potássio (140 mM). Essa mistura deve ser

mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16h. Em seguida o radical é diluído em álcool etílico até obter absorvância de  $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$  a 734 nm.

A partir dos extratos obtidos, foram preparadas soluções 1% de alginato e cada solução foi diluída 4 vezes nas seguintes proporções, 1:5, 2:5, 3:5 e 4:5 (v/v). Para a curva padrão, foi preparada uma solução de trolox (2000  $\mu\text{M}$ ) e a partir dessa solução foram feitas diluições com as seguintes concentrações, 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  e 1500  $\mu\text{M}$ . Todas as amostras foram lidas após 6 minutos de reação com o radical ABTS $\cdot^+$ . A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de Atividade Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) por grama de alginato. As análises foram realizadas em triplicata e em local escuro.

#### 4.6 Comportamento reológico

A análise reológica das soluções 1% de alginato (m/v) foi realizada em reômetro rotacional de cilindros concêntricos (modelo AR2000, TA Instruments) à 25 °C, conforme parceria estabelecida com a USP – Pirassununga/SP, para obtenção das curvas de fluxo, as quais relacionam tensão de cisalhamento e taxa de deformação. Os dados experimentais serão ajustados a modelos reológicos para avaliação do comportamento do fluido: newtoniano (Equação 2) ou não-newtoniano (Equação 3).

$$\tau = \mu \cdot \gamma \quad (2)$$

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad (3)$$

Onde  $\tau$  é a tensão de cisalhamento (Pa),  $\mu$  é a viscosidade dinâmica (Pa.s),  $\gamma$  é a taxa de deformação ( $\text{s}^{-1}$ ),  $k$  é o índice de consistência ( $\text{Pa.s}^n$ ) e  $n$  é o índice de comportamento do fluido (adimensional).

#### 4.7 Viscosidade intrínseca e peso molecular

A viscosidade intrínseca do polissacarídeo extraído sob diferentes tratamentos foi determinada utilizando viscosímetro capilar Cannon-Fenske, mantido em banho termostático a 25 °C. Soluções de alginato foram preparadas nas concentrações de 0,005 – 0,001 g/mL, tendo como solvente solução de NaCl 0,1 M. A viscosidade intrínseca foi determinada usando a expressão empírica de Huggins

(Equação 4) que é definida como o valor de viscosidade reduzida à diluição infinita ( $c \rightarrow 0$ ).

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = \left( \frac{\eta_{sp}}{c} \right)_{c=0} + K_H \left( \frac{\eta_{sp}}{c} \right)_{c=0}^2 * c \quad (4)$$

onde,  $\eta_{sp}$  é a viscosidade específica,  $\eta_{sp}/c$  é a viscosidade reduzida (ml/g),  $k_H$  é o coeficiente de Huggins, e  $c$  é a concentração do polímero (g/ml).

A correlação entre a massa molar viscosimétrica média ( $\overline{M}_v$ ) e a viscosidade intrínseca de uma solução de polímero é descrita pela equação de Mark-Houwink (Equação 5):

$$[\eta] = kM_v^\alpha \quad (5)$$

onde,  $K$  e  $\alpha$  são constantes para um determinado sistema de polímero/solvente/temperatura. De maneira geral,  $0,5 \leq \alpha \leq 0,8$  é encontrado para conformações de cadeias flexíveis, enquanto  $0,8 \leq \alpha \leq 1,0$  para macromoléculas rígidas. Normalmente, o valor de  $K$  diminui com o aumento de  $\alpha$ .

#### 4.8 Validação do delineamento

A partir dos resultados obtidos pela Superfície de Resposta e da função desejabilidade, foi realizada a validação da condição otimizada para extração de alginato de sódio. Derringer & Suich (1980) propuseram o método de função desejabilidade, onde se obtém a desejabilidade global utilizando a média geométrica das respostas normalizadas. A desejabilidade global foi determinada pela Equação 6, que utiliza as desejabilidades individuais de cada resposta combinadas em uma única resposta. Foi realizada a extração com as condições previstas pelo delineamento e comparou-se os valores previstos com os reais.

$$D = (d_1(Y_1) \times d_2(Y_2) \times \dots \times d_k(Y_k))^{1/k} \quad (6)$$

Onde  $D$  é a desejabilidade global,  $d_i(Y_i)$  é a função desejabilidade e  $k$  é o número de variáveis analisadas.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ajuste do modelo e análises estatísticas

Empregou-se o delineamento Box-Behnken com três fatores e três níveis para avaliar o efeito da aplicação de ultrassom na etada ácida da extração de alginato de sódio através da avaliação do rendimento e dos parâmetros de qualidade como, peso molecular, viscosidade intrínseca, caracterização reológica e capacidade antioxidante. O rendimento e a capacidade antioxidante se ajustaram ao modelo polinomial de segunda ordem (Equação 7), enquanto o peso molecular, a viscosidade intrínseca e a viscosidade dinâmica se ajustaram ao modelo linear (Equação 8).

O teste de falta de ajuste e sua significância, assim como a análise de variância ANOVA (Tabela 3), foram utilizados para a validação dos modelos. O impacto de cada coeficiente da equação foi determinado pelos valores de F e p, sendo que valores de p abaixo de 0,05 indicam que o termo é significativo (LIU *et al.*, 2012).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (7)$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 \quad (8)$$

Onde Y é a resposta predita;  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes codificadas;  $\beta_0$  é a intercepção (coeficiente de regressão do modelo);  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  são coeficientes lineares, quadráticos e de interação, respectivamente.

Tabela 2. Delineamento Box-Behnken para as variáveis independentes e suas respostas.

| Tratamentos | Variáveis codificadas |                |                | Valores reais |    |             | Respostas      |                                       |              |            |          |
|-------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------|----|-------------|----------------|---------------------------------------|--------------|------------|----------|
|             | X <sub>1</sub>        | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | Potência (%)  | pH | Tempo (min) | Rendimento (%) | Capacidade antioxidante (µM trolox/g) | µdim (mPa.s) | [η] (dL/g) | Mv (kDa) |
| 1           | 0                     | 0              | 0              | 50            | 2  | 10          | 35,54          | 62,89                                 | 17,32        | 3,67       | 173,33   |
| 2           | 0                     | +1             | -1             | 50            | 3  | 5           | 14,79          | 39,80                                 | 9,97         | 2,33       | 109,45   |
| 3           | 0                     | -1             | +1             | 50            | 1  | 15          | 53,82          | 78,34                                 | 23,47        | 4,29       | 203,26   |
| 4           | 0                     | 0              | 0              | 50            | 2  | 10          | 33,40          | 71,40                                 | 17,63        | 3,44       | 162,68   |
| 5           | +1                    | 0              | +1             | 70            | 2  | 15          | 39,38          | 68,99                                 | 15,73        | 3,29       | 155,31   |
| 6           | 0                     | 0              | 0              | 50            | 2  | 10          | 40,36          | 64,27                                 | 14,82        | 3,34       | 157,65   |
| 7           | -1                    | +1             | 0              | 30            | 3  | 10          | 17,48          | 39,25                                 | 9,20         | 2,10       | 98,28    |
| 8           | +1                    | +1             | 0              | 70            | 3  | 10          | 13,36          | 26,07                                 | 8,17         | 2,01       | 94,28    |
| 9           | -1                    | 0              | +1             | 30            | 2  | 15          | 46,48          | 66,89                                 | 17,15        | 3,23       | 152,52   |
| 10          | 0                     | 0              | 0              | 50            | 2  | 10          | 36,73          | 69,88                                 | 19,13        | 3,31       | 156,33   |
| 11          | -1                    | 0              | -1             | 30            | 2  | 5           | 40,55          | 66,38                                 | 15,85        | 3,27       | 154,18   |
| 12          | +1                    | -1             | 0              | 70            | 1  | 10          | 37,14          | 70,13                                 | 24,30        | 3,97       | 187,88   |
| 13          | +1                    | 0              | -1             | 70            | 2  | 5           | 41,02          | 68,92                                 | 18,62        | 3,37       | 159,09   |
| 14          | 0                     | -1             | -1             | 50            | 1  | 5           | 36,21          | 67,61                                 | 15,20        | 3,91       | 184,79   |
| 15          | 0                     | 0              | 0              | 50            | 2  | 10          | 54,64          | 67,84                                 | 19,62        | 3,53       | 166,93   |
| 16          | 0                     | +1             | +1             | 50            | 3  | 15          | 10,60          | 38,43                                 | 10,63        | 2,58       | 121,46   |
| 17          | -1                    | -1             | 0              | 30            | 1  | 10          | 53,92          | 72,44                                 | 17,37        | 4,12       | 194,84   |

Potências: 30% = 120 W; 50% = 200 W; 70% = 280 W. µdim = viscosidade dinâmica; η = viscosidade intrínseca; Mv = peso molecular.

Tabela 3. Análise de variância do modelo predito para cada resposta.

|                                      | Soma dos<br>quadrados          | gl | Quadrado<br>médio | Valor-F    | Valor-p  |
|--------------------------------------|--------------------------------|----|-------------------|------------|----------|
| <b>[Rendimento]</b>                  |                                |    |                   |            |          |
| Modelo                               | 2802,35                        | 9  | 311,37            | 6,67       | 0,0102*  |
| X <sub>1</sub> - Potência            | 94,74                          | 1  | 94,74             | 2,03       | 0,1973   |
| X <sub>2</sub> - pH                  | 1948,75                        | 1  | 1948,75           | 41,74      | 0,0003*  |
| X <sub>3</sub> - Tempo               | 39,21                          | 1  | 39,21             | 0,84       | 0,3900   |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>          | 11,77                          | 1  | 11,77             | 0,25       | 0,6311   |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup>          | 540,57                         | 1  | 540,57            | 11,58      | 0,0114*  |
| X <sub>3</sub> <sup>2</sup>          | 0,011                          | 1  | 0,011             | 2,415E-004 | 0,9880   |
| X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>      | 40,07                          | 1  | 40,07             | 0,86       | 0,3851   |
| X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>      | 13,44                          | 1  | 13,44             | 0,31       | 0,5969   |
| X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>      | 118,81                         | 1  | 118,81            | 2,54       | 0,1547   |
| Residual                             | 326,83                         | 7  | 46,69             |            |          |
| Perda de ajuste                      | 38,32                          | 3  | 12,77             | 0,18       | 0,9067   |
| Erro puro                            | 288,51                         | 4  | 72,13             |            |          |
| Total                                | 3129,18                        | 16 |                   |            |          |
| R <sup>2</sup> =0,8956               | R <sup>2</sup> ajustado=0,7613 |    |                   |            |          |
| <b>[Capacidade<br/>antioxidante]</b> |                                |    |                   |            |          |
| Modelo                               | 3524,48                        | 9  | 391,61            | 22,10      | 0,0002*  |
| X <sub>1</sub> – Potência            | 14,72                          | 1  | 14,72             | 0,83       | 0,3924   |
| X <sub>2</sub> – pH                  | 2627,04                        | 1  | 2627,04           | 148,28     | <0,0001* |
| X <sub>3</sub> - Tempo               | 12,35                          | 1  | 12,35             | 0,70       | 0,4313   |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>          | 13,14                          | 1  | 13,14             | 0,74       | 0,4176   |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup>          | 769,27                         | 1  | 769,27            | 43,42      | 0,0003*  |
| X <sub>3</sub> <sup>2</sup>          | 22,39                          | 1  | 22,39             | 1,26       | 0,2981   |
| X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>      | 29,54                          | 1  | 29,54             | 1,67       | 0,2376   |
| X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>      | 0,048                          | 1  | 0,048             | 2,732E-003 | 0,9598   |
| X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>      | 36,60                          | 1  | 36,60             | 2,07       | 0,1938   |
| Residual                             | 124,02                         | 7  | 17,72             |            |          |
| Perda de ajuste                      | 71,64                          | 3  | 23,88             | 1,82       | 0,2828   |
| Erro puro                            | 52,38                          | 4  | 13,09             |            |          |
| Total                                | 3648,50                        | 16 |                   |            |          |
| R <sup>2</sup> =0,9660               | R <sup>2</sup> ajustado=0,9223 |    |                   |            |          |

Tabela 3. Análise de variância do modelo predito para cada resposta (continuação).

|                           | Soma dos<br>quadrados          | gl | Quadrado<br>médio | Valor-F | Valor-p  |
|---------------------------|--------------------------------|----|-------------------|---------|----------|
| [μdim]                    |                                |    |                   |         |          |
| Modelo                    | 237,71                         | 3  | 79,24             | 10,41   | 0,0009*  |
| X <sub>1</sub> - Potência | 6,57                           | 1  | 6,57              | 0,86    | 0,3698   |
| X <sub>2</sub> - pH       | 224,40                         | 1  | 224,40            | 29,48   | 0,0001*  |
| X <sub>3</sub> - Tempo    | 6,73                           | 1  | 6,73              | 0,88    | 0,3640   |
| Residual                  | 98,94                          | 13 | 7,61              |         |          |
| Perda de ajuste           | 84,77                          | 9  | 9,42              | 2,66    | 0,1798   |
| Erro puro                 | 14,17                          | 4  | 3,54              |         |          |
| Total                     | 336,65                         | 16 |                   |         |          |
| R <sup>2</sup> =0,7061    | R <sup>2</sup> ajustado=0,6383 |    |                   |         |          |
| [η]                       |                                |    |                   |         |          |
| Modelo                    | 6,64                           | 3  | 2,21              | 47,01   | <0,0001* |
| X <sub>1</sub> - Potência | 8,000E-004                     | 1  | 8,000E-004        | 0,017   | 0,8983   |
| X <sub>2</sub> - pH       | 6,61                           | 1  | 6,61              | 140,32  | <0,0001* |
| X <sub>3</sub> - Tempo    | 0,033                          | 1  | 0,033             | 0,69    | 0,4210   |
| Residual                  | 0,61                           | 13 | 0,047             |         |          |
| Perda de ajuste           | 0,53                           | 9  | 0,058             | 2,71    | 0,1751   |
| Erro puro                 | 0,086                          | 4  | 0,022             |         |          |
| Total                     | 7,25                           | 16 |                   |         |          |
| R <sup>2</sup> =0,9156    | R <sup>2</sup> ajustado=0,8961 |    |                   |         |          |
| [Mv]                      |                                |    |                   |         |          |
| Modelo                    | 15156,86                       | 3  | 5052,29           | 46,88   | <0,0001* |
| X <sub>1</sub> - Potência | 1,33                           | 1  | 1,33              | 0,012   | 0,9133   |
| X <sub>2</sub> - pH       | 15077,16                       | 1  | 15077,16          | 139,90  | <0,0001* |
| X <sub>3</sub> - Tempo    | 78,38                          | 1  | 78,38             | 0,73    | 0,4092   |
| Residual                  | 1401,03                        | 13 | 107,77            |         |          |
| Perda de ajuste           | 1206,40                        | 9  | 134,04            | 2,75    | 0,1709   |
| Erro puro                 | 194,63                         | 4  | 48,66             |         |          |
| Total                     | 16557,90                       | 16 |                   |         |          |
| R <sup>2</sup> =0,9154    | R <sup>2</sup> ajustado=0,8959 |    |                   |         |          |

$\mu$ dim = viscosidade dinâmica;  $\eta$  = viscosidade intrínseca; Mv = peso molecular;

gl = grau de liberdade.

\*Valores estatisticamente significativos.

## 5.2 Efeito das variáveis de extração sobre o rendimento do alginato de sódio

Os resultados de rendimento das 17 extrações de alginato de sódio podem ser observados na Tabela 2. Os maiores valores foram obtidos aplicando os tratamentos 3, 15 e 17. Pode ser observado que o máximo valor de rendimento foi de 54,64%, valor referente à extração 15 (200 W, pH 2 e 10 min), enquanto o menor foi de 10,6%, correspondente à extração 16 (200 W, pH 3 e 15 min). O rendimento máximo obtido está acima da faixa de polissacarídeos encontrados em algas marrons, que segundo Jensen, (2012) e Kraan, (2012) varia entre 30 a 50% do peso seco da alga, e acima dos rendimentos obtidos a partir de métodos convencionais de extração de alginato (GOMEZ *et al.*, 2009; VAUCHEL *et al.*, 2009; JAYASINGHE *et al.*, 2016; NOGUEIRA, 2017; FAWZY *et al.*, 2017).

O modelo quadrático (Equação 9), na forma codificada e com apenas os termos significativos, representou satisfatoriamente a superfície de resposta do delineamento ( $P_s < 0,05$ ), com  $R^2$  alto e a falta de ajuste insignificante (Tabela 3). Portanto, o modelo pode prever os resultados de rendimento do delineamento experimental de Box-Behnken. Os resultados obtidos pela Tabela 3 sugerem que a variável pH exerce grande influência no rendimento, enquanto as outras variáveis, potência e tempo, não mostraram efeito significativo quanto ao rendimento de alginato de sódio, dentro da faixa estudada. A partir das análises das superfícies de resposta (Figura 5), verifica-se que a melhor condição de tratamento é: potência de 120 W, pH 1 e tempo de 15 minutos.

$$\text{Rendimento} = + 40,13 - 15,61 \cdot X_2 - 11,33 \cdot X_2^2 \quad (9)$$

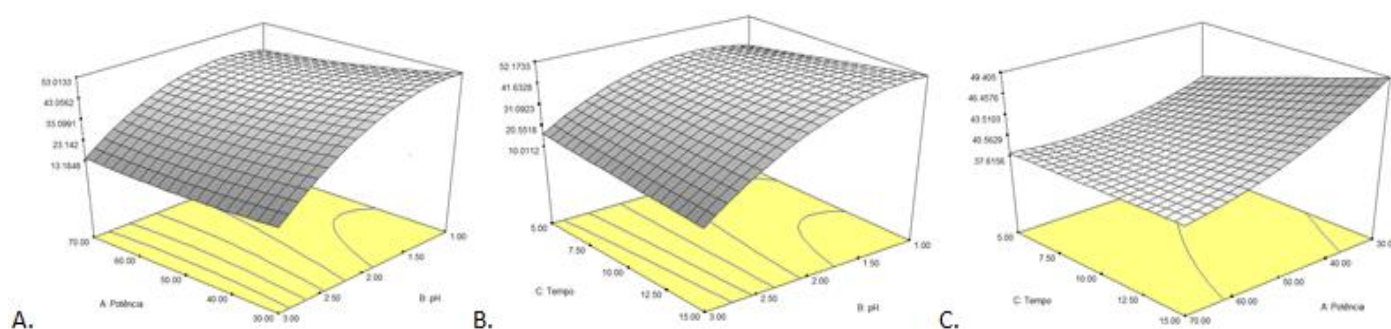


Figura 5. Superfícies de resposta ilustrando a influência da potência, pH e tempo de extração sobre o rendimento do alginato de sódio.

Floréz-Fernández *et al.* (2019), utilizando banho ultrassônico e ácido cítrico separadamente na etapa ácida do processo de extração de alginato a partir de *Sargassum muticum*, obtiveram rendimentos mínimo de 5,7% e máximo de 15%. Porém, os autores verificaram forte influência do tempo de aplicação do ultrassom, resultado divergente do verificado no presente estudo. As diferenças observadas podem ser devido ao tipo de equipamento de ultrassom e a metodologia utilizada.

Youssef *et al.* (2017) otimizaram as condições de extração de alginato de duas algas marrons, *Sargassum binderi* e *Turbinaria ornata*, utilizando banho ultrassônico na etapa alcalina da extração. No estudo, os pesquisadores não utilizaram a etapa ácida na extração, contudo, obtiveram o mesmo rendimento máximo do presente estudo (54%), porém com mais que o dobro de tempo (40 min) e com pH 12. A extração com carbonato de sódio em altas temperaturas é capaz de converter os alginatos insolúveis em alginatos de sódio solúveis, no entanto, o produto obtido permanece com resíduos difíceis de serem eliminados (CUMASHI *et al.*, 2007). Por essa razão, a conversão do ácido algínico em alginato de sódio é muito mais eficiente do que a conversão direta (HOLTKAMP *et al.*, 2009).

### **5.3 Efeito das variáveis de extração sobre a capacidade antioxidante do alginato de sódio**

Os valores das capacidades antioxidantes das 17 extrações de alginato de sódio estão expostos na Tabela 2. As maiores capacidades antioxidantes foram observadas nos tratamentos 3, 4, 12 e 17, sendo o maior valor (78,34  $\mu\text{M}$  trolox/g de alginato) referente à extração 3 (200 W, pH 1 e 15 min) enquanto a menor capacidade antioxidante (26,07  $\mu\text{M}$  trolox/g de alginato) da extração 8 (280 W, pH 3 e 10 min).

O modelo quadrático (Equação 10), na forma codificada e contendo apenas os termos significativos, pôde prever os resultados de capacidade antioxidante, pois representou satisfatoriamente a superfície de resposta do delineamento ( $P_s < 0,05$ ), com  $R^2$  alto e falta de ajuste insignificante (Tabela 3). De acordo com os resultados obtidos pela Tabela 3, apenas a variável pH mostrou ser um termo significativo do modelo, enquanto as outras variáveis, potência e tempo, não apresentaram efeito significativo quanto a capacidade antioxidante do alginato de sódio, dentro da faixa estudada. A partir das análises das superfícies de resposta

(Figura 6), verifica-se que a melhor condição de tratamento é: potências acima de 200 W, pH 1 e 15 minutos.

$$\text{Capacidade antioxidante} = + 67,26 - 18,12 \cdot X_2 - 13,52 \cdot X_2^2 \quad (10)$$

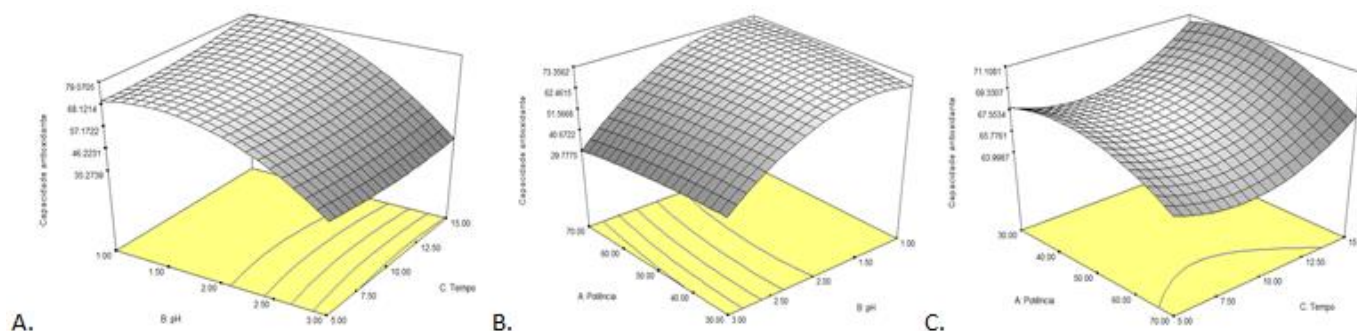


Figura 6. Superfícies de resposta ilustrando a influência da potência, pH e tempo de extração sobre a capacidade antioxidante do alginato de sódio.

As 17 amostras de alginato de sódio apresentaram capacidade antioxidante, mesmo que baixa, indicando que possuem a função de capturar radicais livres. Yamachita (2017) e Nogueira (2017) encontraram valores máximos de capacidade antioxidante de alginato de sódio extraído convencionalmente de, respectivamente, 49,68 e 50,45  $\mu\text{M}$  trolox/g de alginato.

A habilidade do polissacarídeo de capturar o radical ABTS é devido a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio para inativar esse radical (LI *et al.*, 2012; SENTHILKUMAR *et al.*, 2013). No entanto, a transferência de elétrons é menos provável de ocorrer em carboidratos e o que geralmente ocorre é a transferência de átomos de hidrogênio. A adição de radical não é considerado um mecanismo provável de ocorrer, pois os carboidratos nem sempre apresentam dupla ligação ou anel aromático.

Entretanto, Falkeborg *et al.* (2014), sugeriram um mecanismo que envolve adição de radical para a capacidade antioxidante devido a presença de dupla ligação entre o C-4 e C-5. Segundo Kelishomi *et al.* (2016) o mecanismo antioxidante do alginato é, provavelmente, resultado da captura do radical através de transferência de átomos de hidrogênio e adição de radical. O aumento da capacidade antioxidante pode estar relacionado com a formação de hidroxilas, carbonilas, carboxilas e dupla ligação entre C-4 e C-5 que são formadas pela despolimerização térmica do alginato como consequência de clivagem de ligações glicosídicas.

O tratamento com ultrassom pode induzir a degradação do polissacarídeo e supõe-se que grupos químicos em amostras degradadas tem maior chance de entrar em contato com o radical devido à maior superfície de contato e melhor solubilidade em água (ZHANG *et al.*, 2013). Dessa forma, alguns estudos verificaram que a capacidade antioxidante do alginato aumenta com a diminuição de seu peso molecular. (KELISHOMI *et al.*, 2016; FALKEBORG *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2012; SEN & ATIK, 2012). Não foi verificado uma relação entre o aumento da capacidade antioxidante com a diminuição do peso molecular, no entanto, outros fatores, como o pH, podem ter influenciado a quantificação da capacidade antioxidante.

#### **5.4 Efeito das variáveis de extração sobre a viscosidade dinâmica (caracterização reológica) do alginato de sódio**

As viscosidades dinâmicas das 17 amostras de alginato de sódio podem ser observadas na Tabela 2. A extração 12 (280 W, pH1 e 10 min) apresentou o maior valor de viscosidade dinâmica de 24,3 mPa.s, enquanto o menor valor foi de 9,2 mPa.s referente à extração 7 (120 W, pH 3 e 10 min).

Apesar do modelo linear ajustar melhor os dados experimentais e possuir falta de ajuste insignificante, o  $R^2$  foi razoavelmente baixo (Tabela 3), próximo ao limite mínimo ( $R^2=0,7$ ) para que possa ser considerado satisfatório (MOORE, 2010). De acordo com a Tabela 3, o pH foi um termo significativo para o modelo, enquanto potência e tempo não apresentaram significância. O modelo linear, contendo apenas os termos significativos e na forma codificada pode ser observado na Equação 11.

$$\text{Viscosidade dinâmica} = +16,13 - 5,30 \cdot X_2 \quad (11)$$

A partir das análises das superfícies de resposta (Figura 7), verifica-se que a melhor condição de tratamento é: 280 W, pH 1, 15 minutos.



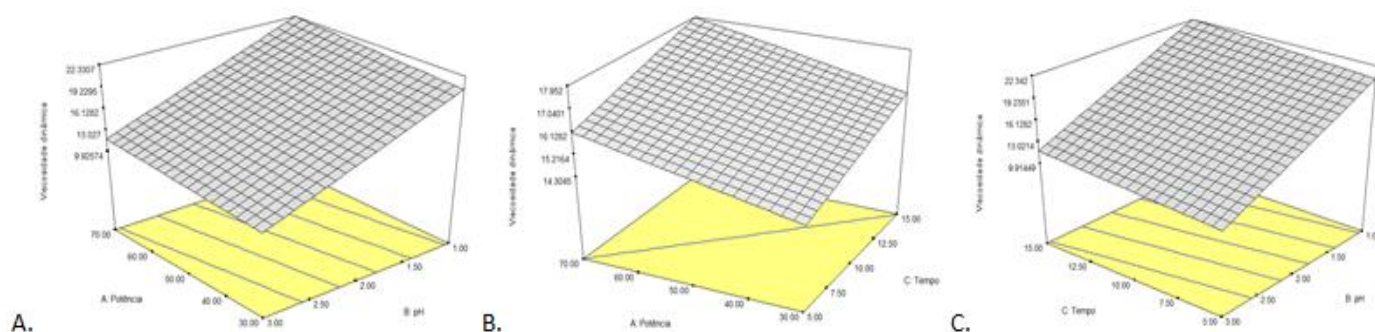


Figura 7. Superfícies de resposta ilustrando a influência da potência, pH e tempo de extração sobre a viscosidade dinâmica do alginato de sódio.

As curvas de fluxo, ou reogramas, dadas pela relação de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) por taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) (Figura 8) e viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) por taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) (Figura 9), permitem avaliar o comportamento de fluxo das soluções de alginato de sódio. A partir dessas curvas, é possível dizer se um determinado fluido apresenta comportamento de fluxo Newtoniano ou não-Newtoniano (BONGIOVANI *et al.*, 2008).

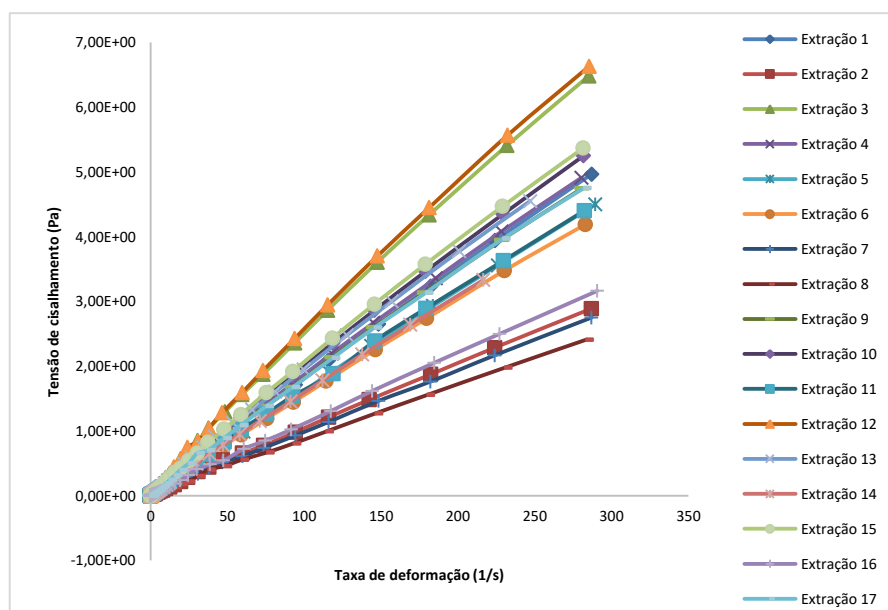


Figura 8. Reograma da tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) das soluções de alginato de sódio 1%.

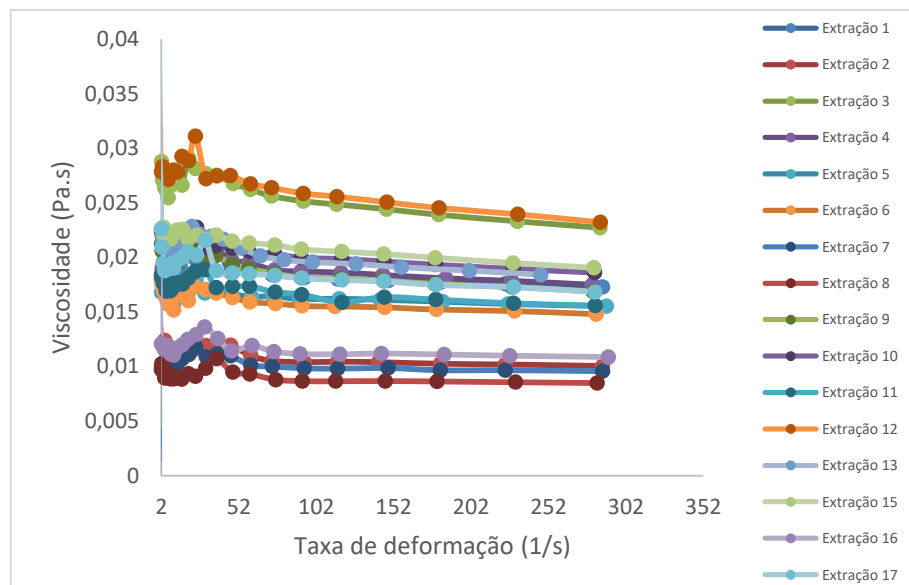


Figura 9. Reograma da viscosidade aparente ( $\mu\text{ap}$ ) em função da taxa de deformação ( $\gamma$ ) das soluções de alginato de sódio 1%.

Fluídos Newtonianos apresentam uma relação linear entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento e viscosidade constante com a variação da taxa de cisalhamento (KAWATRA & BAKSHI, 1996). As 17 soluções de alginato de sódio 1% apresentaram comportamento de fluídos Newtonianos, pois a relação tensão de cisalhamento e taxa de deformação foi linear, com coeficientes de ajuste ( $R^2$ ) acima de 0,9 (Figura 8), enquanto que a viscosidade das amostras permaneceu constante com o aumento da taxa de deformação (Figura 9).

O mesmo comportamento reológico foi observado por Torres *et al.* (2007) e Gomez *et al.* (2009). Entretanto, outros estudos reológicos verificaram comportamento não-Newtoniano tipo pseudoplástico do alginato (EL ATOUANI *et al.*, 2016; FENORADOSOA *et al.*, 2010; ONSØYEN, 1997; MANCINI *et al.*, 1996). Não foram encontrados estudos reológicos de alginato de sódio extraído com aplicação de ultrassom.

### 5.5 Efeito das variáveis de extração sobre a viscosidade intrínseca e o peso molecular do alginato de sódio

As viscosidades intrínsecas e pesos moleculares das 17 amostras de alginato de sódio podem ser observadas na Tabela 2. A extração 3 (200 W, pH1 e 15 min) apresentou os maiores valores para a viscosidade intrínseca (4,29 dL/g) e peso molecular (203,26 kDa), enquanto os menores valores de viscosidade intrínseca

(2,01 dL/g) e respectivo peso molecular (94,28 kDa) foi verificado com a extração 8 (280 W, pH 3 e 10 min).

O modelo linear (Equação 12 e 13), na forma codificada e contendo apenas os termos significativos, representou satisfatoriamente a superfície de resposta do delineamento ( $P_s < 0,05$ ), com  $R^2$  alto e falta de ajuste insignificante (Tabela 3). A partir dos resultados observados na Tabela 3, novamente o pH foi a única variável que mostrou ser um termo significativo do modelo, enquanto potência e tempo não apresentaram efeito significativo sobre a viscosidade intrínseca e peso molecular do alginato de sódio, dentro da faixa estudada. A partir das análises das superfícies de resposta (Figura 10 e 11), verifica-se que a melhor condição de tratamento para as duas respostas é: potência de 120 W, pH 1 e 15 minutos.

$$\text{Viscosidade intrínseca} = + 3,28 - 0,91 \cdot X_2 \quad (12)$$

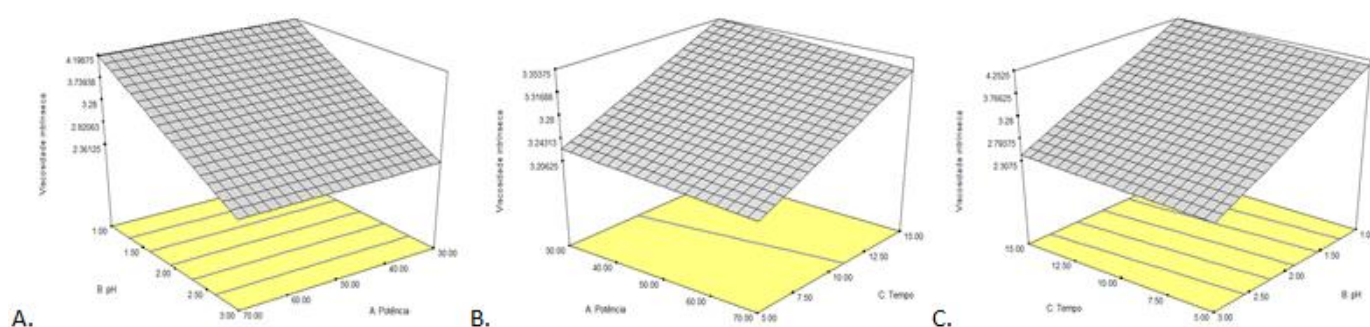


Figura 10. Superfícies de resposta ilustrando a influência da potência, pH e tempo de extração sobre a viscosidade intrínseca do alginato de sódio.

$$\text{Peso molecular} = + 154,84 - 43,41 \cdot X_2 \quad (13)$$

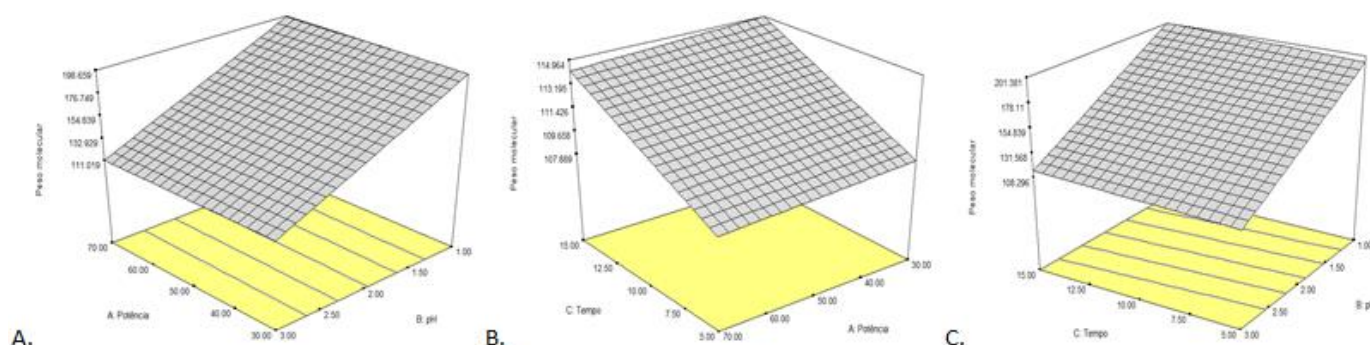


Figura 11. Superfícies de resposta ilustrando a influência da potência, pH e tempo de extração sobre o peso molecular do alginato de sódio.

A viscosidade intrínseca, uma propriedade característica de uma única macromolécula dispersa em um solvente, é uma medida do volume hidrodinâmico ocupado pelo próprio polímero. Esta medida depende do peso molecular, rigidez da cadeia e da qualidade do solvente (Launey *et al.*, 1986).

Comparando com outros trabalhos, que utilizaram extração convencional, as viscosidades intrínsecas e pesos moleculares máximos encontrados no presente trabalho corresponderam aos menores valores encontrados por Torres *et al.* (2007), que verificaram viscosidade intrínseca de 4,1 e 6,9 dL/g e peso molecular de, respectivamente, 194 e 330 kDa de alginato de sódio de alga do gênero *Sargassum vulgare*. Larsen *et al.* (2003) encontraram valores de viscosidade intrínseca e peso molecular muito maiores entre algumas espécies de *Sargassum*: 12,6 dL/g e 606 kDa para *Sargassum dentifolium*, 15,2 dL/g e 734 kDa para *Sargassum asperifolium* e 8,7 dL/g e 416 kDa para *Sargassum latifolium*.

Fawzy *et al.* (2016) verificaram peso molecular de *Sargassum latifolium* na faixa de 141 a 221 kDa, valores inferiores ao observado por Larsen *et al.*, (2003), indicando que a localização geográfica e a época do ano em que as algas são colhidas, podem influenciar tanto no peso molecular, quanto na viscosidade.

Lorbeer *et al.* (2015) otimizaram os parâmetros do tratamento ácido da extração convencional de alginato de *Ecklonia radiata* e, assim como no presente estudo, o pH foi o parâmetro que mais influenciou o peso molecular. No entanto, em contra partida, encontraram uma relação diretamente proporcional entre pH e peso molecular, ou seja, quanto maior o pH, maior o peso molecular, diferentemente do que foi observado neste trabalho.

Youssouf *et al.* (2017) encontraram uma faixa de 1 a 100 kDa, por cromatografia de exclusão de tamanho, em alginatos de *Sargassum binderi* extraídos com aplicação de banho ultrassônico por 30 minutos. Os alginatos de baixo peso molecular podem ter sido formados por degradação via despolimerização causado pelo ultrassom. Dessa forma, o tempo de aplicação de ultrassom pode gerar alginatos de baixo peso molecular (FENG *et al.*, 2017).

## 5.6 Otimização e validação do delineamento

A partir da função desejabilidade, foi verificado que a condição otimizada do delineamento foi através da aplicação de 176 W de potência do ultrassom, durante 15 minutos, sob pH 1 do ácido cítrico para obtenção de valores máximos para todas

as respostas, sendo observado nestas condições, rendimento de 54,64%, capacidade antioxidante de 77,94  $\mu\text{M}$  trolox/g de alginato, viscosidade intrínseca de 4,25 dL/g e peso molecular de 201,48 kDa. O valor da desejabilidade foi de 0,963 e está dentro da faixa aceitável ( $0 \leq d \leq 1$ ), uma vez que quanto mais próximo de um, maior será a adequação das variáveis independentes na otimização (Derringer & Suich, 1980).

O tratamento ácido realizado na condição otimizada apresentou rendimento de 54,20%, capacidade antioxidante de 80,81  $\mu\text{M}$  trolox/g de alginato, viscosidade intrínseca de 4,28 dL/g e peso molecular de 202,56 kDa. Todos os valores obtidos estão muito próximos dos valores preditos pelo programa e dos valores observados no tratamento 3.

### 5.7 Avaliação da substituição do tipo de ácido, na condição otimizada, sobre o rendimento e os parâmetros de qualidade do alginato de sódio

A partir da condição otimizada do delineamento, foram realizadas duas extrações para comparar o impacto do ácido cítrico e do ácido clorídrico no rendimento e nos parâmetros de qualidade (capacidade antioxidante, viscosidade dinâmica, viscosidade intrínseca e peso molecular) dos alginatos de sódio extraídos. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação dos ácidos.

| Tratamento    | Rendimento (%) | Capacidade antioxidante ( $\mu\text{M}$ trolox/g) | $[\eta]$ (dL/g) | Mv (kDa) |
|---------------|----------------|---------------------------------------------------|-----------------|----------|
| Ácido cítrico | 49,70          | 82,37                                             | 4,22            | 199,74   |
| HCl           | 32,31          | 43,51                                             | 4,37            | 207,09   |

$\eta$  = viscosidade intrínseca; Mv = peso molecular.

O tratamento com ácido cítrico gerou rendimento maior do que o tratamento com ácido clorídrico. No entanto, em alguns trabalhos com extração convencional utilizando ácido clorídrico na etapa ácida, foram obtidos rendimentos na mesma faixa do presente trabalho empregando ácido cítrico (NOGUEIRA, 2017; YOUSSEF *et al.*, 2017; FERTAH *et al.*, 2013). Deve ser salientado que os altos rendimentos com ácido clorídrico foram obtidos após longas horas de extração (McHUGH *et al.*; 2001; LORBEER *et al.*, 2015; NOGUEIRA, 2017).

A capacidade antioxidante do tratamento com ácido cítrico foi quase o dobro do valor da capacidade antioxidante do tratamento com ácido clorídrico. O ácido cítrico é um antioxidante natural e esta característica pode ter influenciado a capacidade antioxidante. Os valores de viscosidade intrínseca e peso molecular do tratamento com ácido cítrico foi menor, porém próximo, do tratamento com ácido clorídrico. Esses resultados indicam que a substituição do ácido clorídrico pelo ácido cítrico, junto com aplicação de ultrassom, se mostrou satisfatória.

## 6 CONCLUSÃO

O emprego do delineamento Box-Behnken foi adequado para encontrar a condição otimizada dos parâmetros da etapa ácida da extração de alginato de sódio a partir da alga *Sargassum* spp., utilizando sonda ultrassônica e ácido cítrico como substituto do ácido clorídrico.

O pH teve a maior influência no processo de extração, sendo que a sua redução melhorou o rendimento e a qualidade do alginato extraído, enquanto que a potência e tempo de aplicação do ultrassom não tiveram nenhum efeito sobre os parâmetros de qualidade avaliados.

O máximo de rendimento (54,20%), de capacidade antioxidante (80,81  $\mu$ M trolox/g de alginato), de viscosidade intrínseca (4,28 dL/g) e de peso molecular (202,56 kDa) foram preditos para a extração com aplicação de 176 W de potência do ultrassom, durante 15 minutos, sob pH 1 do ácido cítrico.

Todas as soluções de alginato de sódio 1 %, obtidas dos diferentes tratamentos, apresentaram comportamento de fluido Newtoniano, ou seja, viscosidade constante com aumento da taxa de deformação, obedecendo a lei de Newton.

A substituição do ácido clorídrico pelo cítrico na extração do alginato com ultrassom resultou em valores maiores de rendimento e capacidade antioxidante para o alginato extraído com ácido cítrico. Entretanto, a viscosidade intrínseca e o peso molecular tiveram valores próximos para os dois ácidos.

A aplicação da sonda ultrassônica mostrou-se promissora na extração de alginato de sódio, com diminuição do tempo de processo de extração quando comparado com o processo de extração tradicional.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALGAEBASE, 2012. Disponível em <  
<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=5187>> Acessado no dia 10 de outubro de 2019.
- ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY, 2019. Where did Brazil import Alginic acid from in 2017. Disponível em <  
<http://atlas.cid.harvard.edu/explore?country=32&product=6680&year=2017&tradeDirection=import&productClass=HS&target=Product&partner=undefined&startYear=undefined>> Acessado no dia 10 de outubro de 2019.
- ANDRIAMANANTOANINA, H.; RINAUDO, M. Characterization of the alginates from five madagascan brown algae. **Carbohydrate Polymers**. v. 82, p. 555–560, 2010.
- ASHOKKUMAR, M.; MASON, T.J. Sonochemistry. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. John Wiley and Sons, Inc. 2007.
- BONGIOVANI, R.A.M. Características reológicas do exopolissacarídeo botriosferana produzido pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em três fontes de carbono: glucose, frutose e sacarose, 2008.
- CALUMPONG, P.H.; MAYPA, P.A.; MAGBANUA, M. **Hydrobiologia**. v. 398, p. 211–215, 1999.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.S; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.
- COIMBRA, C. S. Inferências filogenéticas a ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum*. Tese (doutorado). Departamento de Botânica, Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, São Paulo, 75p, 2006.
- CUMASHI, A.; USHAKOVA, N.A.; PREOBRAZHenskAYA, M.E.; D'INCECCO A.; PICCOLI A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G.E.; BERMAN, A.E.; BILAN, M.I.; USOV, A.I.; USTYUZHANINA, N.E.; GRACHEV, A.A.; SANDERSON, C.J.; KELLY, M.; RABINOVICH, G.A.; IACOBELLI, S.; NIFANTIEV, N.E. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541–552, 2007.

- DE OLIVEIRA, E.C.; HORTA, P.A.; AMANCIO, C.E.; SANT'ANNA, C.L. Algas e angiospermas marinhas bêmicas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 61p, 2002.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219, 1980.
- DRAGET, K.I.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 47-55, 1997.
- EL ATOUANI, S.; BENTISS, F.; REANI, A.; ZRID, R.; BELATTMANIA, Z.; PEREIRA, L.; MORTADI, A.; CHERKAOU, O.; SABOUR, B. The invasive brown seaweed *Sargassum muticum* as new resource for alginate in Morocco: Spectroscopic and rheological characterization. **Phycological Research**, n. 64, v. 3, p. 185-193, 2016.
- FALKEBORG, M.; CHEONG, L.Z.; GIANFICO, C.; SZTUKIEL, K. M.; KRISTENSEN, K.; GLASIUS, M.; GUO, Z. Alginate oligosaccharides: Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation. **Food Chemistry**, v.164, p.185–194, 2014.
- FAWZY, M. A.; GOMAA, M.; HIFNEY, A. F.; ABDEL-GAWAD, K. M. Optimization of alginate alkaline extraction technology from *Sargassum latifolium* and its potential antioxidant and emulsifying properties. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p.1903–1912, 2017.
- FERTAH, M.; BELFKIRA, A.; DAHMANE, E.M.; TAOURIRTE, M.; BROUILLETTE, F. Extraction and characterization of sodium alginates from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed, **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.
- FENG, L.; CAO, Y.; XU, D.; WANG, S.; ZHANG, J. Molecular weight distribution, rheological property and structural changes of sodium alginate induced by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 609-615, 2017.
- FENORADOSOA, T. A.; ALI, G.; DELATTRE, C.; LAROCHE, C.; PETIT, E.; WADOUACHI, A.; MICHAUD, P. Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. **Journal of applied phycology**, n. 22, v. 2, p. 131-137, 2010.
- FLEITA, D.; EL-SAYED, M.; RIFAAT, D. Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1236-1244, 2015.
- FLÓREZ-FERNÁNDEZ, N.; DOMÍNGUEZ, H.; TORRES, M.D. A green approach for alginate extraction from *Sargassum muticum* brown seaweed using ultrasound-



assisted technique. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 451-459, 2019.

GOGATE, P.R.; SUTKAR, V.S.; PANDIT, A.B. Sonochemical reactors: important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 166, p. 1066-1082, 2011.

GOGATE, P.R.; WILHELM, A.M.; PANDIT, A.B. Some aspects of the design of sonochemical reactors. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, p. 325-330, 2003.

GOMEZ, C. G.; LAMBRECHT, M. V. P.; LOZANO, J. E., RINAUDO, M.; VILLAR, M. A. Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystispyrifer*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 365–371, 2009.

HAHN, T.; KELLY, S.; MUFFIER, K.; TIPPKÖTTER, N.; ULBER, R. Extraction of Lignocellulose and Algae for the Production of Bulk and Fine Chemicals. **Industrial Scale Natural Products Extraction**, p. 221–245, 2011.

HAUGAN, J.A.; LIAAEN-JENSEN, S. Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 1, p. 31-41, 1994.

HOLTKAMP, A.D.; KELLY, S.; ULBER, R.; LANG S. Fucoidans and fucoidanases – focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 82, n. 1, 2009.

INDERGAARD, M.; SKJAK-BRAEK, G.; JENSEN, A. Studies on the influence of nutrients on the composition and structure of alginate in *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. (Laminariales, Phaeophyceae). **Botanica Marina**, v. 33, p. 277–288, 1990.

INDERGAARD, M.; SKJAK-BRAEK, G. Characteristics of alginate from *Laminaria digitata* cultivated in a high-phosphate environment. **Hydrobiologia**, v. 151/152, p. 541–549, 1987.

JAYASHINGE, P.S.; PAHALAWATTAARACHCHI, V.; RANAWEERA, K.K.D.S. Effect of extraction methods on the yield and physiochemical properties of polysaccharides extracted from seaweed available in Sri Lanka. **Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences**, v. 4, n. 1, 2016.

JENSEN, A. Present and future needs for algae and algal products. Fourteenth international seaweed symposium: proceedings of the fourteenth international seaweed symposium held in brest, France, p. 15-23, 2012.

- KADAM, S. U.; PRABHASANKAR, P. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. **Food Research International**, v. 43, p. 1975 – 1980, 2010.
- KADAM, S.U.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C. Application of novel extraction technologies for extraction of bioactives from marine algae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61 (20), p. 4667–4675, 2013.
- KADAM, S.U.; ÁLVARES, C.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C. Extraction of biomolecules from seaweed. **Seaweed Sustainability**, chapter 9, 27p, 2015a.
- KADAM, S.U.; TIWARI, B.K.; SMYTH, T. J.; O'DONNELL, C. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 308-316, 2015b.
- KAWATRA, S. K., BAKSHI, A. K. On-line measurement of viscosity and determination of flow types for mineral suspensions. **International Journal of Mineral Processing**. v. 47, p.275-283, 1996.
- KELISHOMI, Z. H.; GOLIAEI, B.; MAHDAVI, H.; NIKOOFAR, A.; RAHIMI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; BIGDELI, B. Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment. **Food Chemistry**, v.196, p.897–902, 2016.
- KHAN, M. K., ABERT-VIAN, M., FABIANO-TIXIER, A. S., DANGLES, O., CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, v. 119, p. 851–858, 2010.
- KRAAN, S. Algal polysaccharides, novel applications and outlook. **Carbohydrates – comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology**, chapter 22, 2012.
- LARSEN, B.; SALEM, D. M.; SALLAM, M. A.; MISHRIKEY, M. M.; BELTAGY, A. I. Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea coast. **Carbohydrate research**, n. 338, v. 22, p. 2325-2336, 2003.
- LAUNEY, B.; DOUBLIER, J. L.; CUVELIER, G. Flow properties of aqueous solutions and dispersions of polysaccharides. **Functional Properties of Food Macromolecules**, eds J. R. Mitchell, D. A. Ledward. Elsevier, London, p. 1-78, 1986.
- LIU, Y.; WANG, J.; ZHENG, Y.; WANG, A. Adsorption of methylene blue by kapok fiber treated by sodium chlorite optimized with response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, n. 184, p. 248-255, 2012.
- LORBEER, A. J.; LAHNSTEIN, J.; BULONE, V.; NGUYEN, T.; ZHANG, W. Multiple-response optimization of the acidic treatment of the brown alga *Ecklonia radiata* for the

- sequential extraction of fucoidan and alginate. **Bioresource Technology**, v.197, p.302-309, 2015.
- LUQUE-GARCÍA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 41-47, 2003.
- LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, Å.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.42, n.1, p.3-40, 1998.
- MAFRA JR, L. L.; CUNHA, S. R. Bancos de *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae) na enseada de armação do Itapocoroy, Penha, SC: Biomassa e rendimento em alginato. **Notas Técnicas Facimar**, v.6, p.111-119, 2002.
- MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. Rheological behaviour of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, n. 28, v. 3-4, 283-295, 1996.
- McHUGH, D. J.; HERNANDEZ-CARMONA, G.; ARVIZU-HIGUERA, D. L.; RODRIQUEZ-MONTESINOS, Y. E. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 471–479, 2001.
- McHUGH, D. J. Production, properties and uses of Alginates. In **FAO Fisheries Technical Papers**, p. 58–115, 1987.
- MOORE, D. S. The basic practice of statistics. **Palgrave Macmillan**, 2010.
- MEROUANI, S.; HAMD AOUI, O.; REZGUI, Y.; GUEMINI, M. Theoretical procedure for the characterization of acoustic cavitation bubbles. **Acta Acustica United With Acustica**, v.100, p. 823-833, 2014.
- MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, São Carlos, v 21, n.4, p.305-310, 2011.
- MURUGADAS, T. L., PHANG, S. M.; TONG, S. L. Heavy metal accumulation cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.39, n.8, p.2129–2131, 1995.
- NOGUEIRA, T.M. Extração e caracterização de alginato de sódio da macroalga *Sargassum cymosum* C. Agardh. Tese (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biociências – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Assis, 61p, 2017.
- OLIVEIRA-FILHO, E. A exploração de algas marinhas no Brasil: Situação actual e perspectivas futuras. **Phycology latino americano**, v.1, p.5–18, 1981.

- ONSØYEN, E. Alginates. In Imeson, A. P. (Ed.) *Thickening and Gelling Agents for Food*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, Netherlands, p. 22–44, 1997.
- PAULA, E.J. O gênero *Sargassum* (Phaeophyta-Fucales) no litoral do Estado de São Paulo, **Boletim de Botânica**, Universidade de São Paulo, v.10, p.65-118, 1988.
- PÉREZ, R.; KAAS, R.; CAMPELLO, F.; ARBAULT, S.; BARBAROUX, O. La culture des algues marines dans le monde. Editions IFREMER, Plouzané, France, p. 613, 1992.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Algal Polysaccharides. **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, v. 2, 1967.
- PRINCE, J.S.; O'NEAL, S.W. The ecology of *Sargassum pteropleuron* in the waters off South Florida. I. Growth, reproduction and population structure. **Phycologia**, v.18, p.109-114, 1979.
- ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmagnosia**. v.17, n.4, p.631-639, 2007.
- RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Comunicado técnico – metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. *Fortaleza: Embrapa*, 4 p, 2007.
- SANTOS, H.M.; LODEIRO, C.; CAPELO-MARTÍNEZ, J.L. The power of ultrasound. In: Capelo-Martínez, J.L. (Ed.), **Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications**. Wiley-VCH. 2008.
- SEN, M.; ATIK, H. The antioxidant properties of oligo sodium alginates prepared by radiation-induced degradation in aqueous and hydrogen peroxide solutions. **Radiation Physics and Chemistry**, v.81, n.7, p.816–822, 2012.
- SHARMA, A.; GUPTA, M.N. Three phase partitioning of carbohydrate polymers: separation and purification of alginates. **Carbohydrate Polymers**. v. 48, p. 391, 2002.
- SHIRSATH, S.; SONAWANE, S.; GOGATE, P. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – a review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10-13, 2012.
- SIME, W.J. Alginates. **Food Gels**. Elsevier Applied Food Science Series, p. 53-78, 1990.

- SIMEONE, M.; ALFANI, A.; GUIDO, S. Phase diagram, rheology and interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 463, 2004.
- SORIA, A.C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 323-331, 2010.
- SKJAK-BRAEK, G.; GRASDALEN, H.; LARSEN, B. - **Carbohydrate Research**, v.154, p.239, 1986.
- TEKIN, K., AKALIN, M. K., SEKER, M. G. Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 954–960, 2015.
- VAUCHEL, P.; LEROUX, K.; KAAS, R.; ARHALIASS, A.; BARON, R.; LEGRAND, J. Kinetics modeling of alginate alkaline extraction from *Laminaria digitata*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1291-1296, 2009.
- WANG, W.; YANG, X.; CHEN, S.; ZHANG, C.; CHEN, L.; XIE, W. Method for preparing biscuit from *Sargassum*. Patente no A21D13/08; A21D2/36; A23L1/164; A23L1/29; A23L1/337. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu. p.1-6, 2008.
- WIDAYATI, S., S. N. ROCHMAH DAN ZUBEDI. Biologi: SMA dan MA Kelas X. Pusat Perbukuan, Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta, p. 290, 2009.
- WONG PAZ, J. E., MUNIZ MÁRQUEZ, D. B., MARTÍNEZ ÁVILA, G. C., BELMARES CERDA, R. E., AGUILAR, C. N. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 474–481, 2015.
- YAMASHITA, C. Efeito da aplicação de ozônio na qualidade de alginato extraído de algas pardas (*Sargassum* spp.). Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biociências – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Assis, 58p, 2017.
- YOUSSEF, L., LALLEMAND, L., GIRAUDA, P., SOULÉA, F., BHAW-LUXIMONC, A., MEILHAC, O., D'HELLENCOURT, C.L., JHURRYC, D., COUPRIEA, J. Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 55-63, 2017.

ZHANG, Z.; LV, G.; HE, W.; SHI, L.; PAN, H.; FAN, L. Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*, **Carbohydrate Polymers**. n. 98, v. 2, p. 1524–1531, 2013.

ZHAO, X.; LI, B.; XUE, C.; SUN, L. Effect of molecular weight on the antioxidant property of low molecular weight alginate from *Laminaria japonica*. **Journal of Applied Phycology**, v.24, n.2, p.295–300, 2012.