

CAMILA YAMASHITA

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE OZÔNIO
NA QUALIDADE DE ALGINATO
EXTRAÍDO DE ALGAS PARDAS
(*SARGASSUM* SPP.)**

ASSIS

2019

CAMILA YAMASHITA

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE OZÔNIO
NA QUALIDADE DE ALGINATO
EXTRAÍDO DE ALGAS PARDAS
(*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

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

ASSIS

2019

| | |
|------|--|
| Y19e | <p>Yamashita, Camila</p> <p>Efeito da aplicação de ozônio na qualidade de alginato extraído de algas pardas (<i>Sargassum</i> spp.). / Camila Yamashita. -- Assis, 2019</p> <p>58 f.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Letras, Assis</p> <p>Orientadora: Ivanise Guilherme Branco</p> <p>1. Ozônio. 2. Alga Parda. 3. Alginato. 4. Otimização. 5. Atividade Antioxidante. I. Título.</p> |
|------|--|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Letras, Assis. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito da aplicação de ozônio na qualidade de alginato extraído de algas pardas (*Sargassum* spp.)

AUTORA: CAMILA YAMASHITA

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:

Ivanise Guilherme Branco

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

Cassia Roberta Malacrida Mayer

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

Ízabel Cristina Freitas Moraes

Profa. Dra. ÍZABEL CRISTINA FREITAS MORAES
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / USP/Pirassununga

Assis, 06 de março de 2019

Dedico este trabalho aos meus pais, Regina e Nelson, meus maiores exemplos. Sem o apoio e ensinamentos de vocês, não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar em cada passo que dou e por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

À Prof^a Ivanise pela orientação e ensinamentos durante todos esses anos.

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

Aos colaboradores técnicos-administrativos Sérgio, Alan e Gilberto que não mediram esforços ao me auxiliar na pesquisa.

À Dani e ao Sinésio pelas conversas otimistas matutinas.

Aos colaboradores da Seção de Pós-Graduação, Natália, Lino e Marcos, que tanto me auxiliaram em todas as etapas do mestrado.

Aos ex-companheiros de laboratório Assay, Adriana, Karen e Marcela que mesmo já finalizado suas pesquisas, me auxiliaram na conclusão da minha.

À Letícia, companheira de laboratório, pela ajuda e companheirismo.

À amiga que o mestrado me deu, Fer, pela amizade e parceria nos bons e maus momentos.

Aos amigos de outros laboratórios e da vida, Edson, Joyce e André pela energia positiva, amizade, companheirismo e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Às minhas ex-colegas de casa, Bruna, Mari e Matheus (agregado) pelo otimismo e apoio nas horas mais difíceis.

Às pessoas dispostas a compartilharem seus conhecimentos em Ressonância Nuclear Magnética com toda paciência e receptividade, Ícaro e Lucinéia.

Ao Edson, profissional da OzonioBras, por me auxiliar a entender os parâmetros de funcionamento do ozonizador com tanta dedicação.

Às amigas de infância Camila, Fernanda, Priscilla e Renata que acompanham e torcem tanto por mim.

Aos meus pais, Regina e Nelson, por me apoiarem e não medirem esforços para meu crescimento profissional.

À minha irmã, Adriana, por fazer parte dos momentos de descontração, auxílio, incentivo e por sempre lembrar de acreditar em mim.

Ao meu namorado, Rafael, pelo amor, compreensão e por sempre acreditar e me fazer acreditar que no fim tudo daria certo.

Às cadelinhas, Laila e Tuca, por toda alegria contagiante.

À Banca da qualificação, Bruno e Rosana, pelas sugestões e correções realizadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro (Código de financiamento 001).

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma colaboram para realização deste trabalho. Meu reconhecimento e gratidão!

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”. (Mahatma Gandhi)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

YAMASHITA, Camila. **Efeito da aplicação de ozônio na qualidade de alginato extraído de algas pardas (*Sargassum spp.*)**. 2019. 58 f. Dissertação (Mestrado acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2019.

RESUMO

O alginato, presente na parede celular das algas marinhas pardas, apresenta coloração marrom, sendo necessário seu branqueamento para melhor aceitabilidade do mercado consumidor. O gás ozônio (O₃) tem mostrado grande potencial de aplicabilidade como agente clareador mais sustentável. O presente estudo visa a otimização, utilizando a análise de superfície de resposta, dos parâmetros de clareamento (tempo, fluxo de oxigênio e temperatura), utilizando ozônio como agente branqueador, sobre os parâmetros colorimétricos (porcentagem de transmitância e índice de luminosidade), composição química (razão entre os ácidos manurônico (M) e gulurônico (G) M/G) e propriedades reológicas (viscosidade dinâmica, viscosidade intrínseca e massa molar) do alginato de sódio extraído de algas pardas (*Sargassum spp.*). Nas condições otimizadas de clareamento também foi verificada a influência da ozonização sobre a atividade antioxidante do alginato. O tempo é a variável independente que apresentou maior influência nas respostas, seguido da temperatura e fluxo de oxigênio. A condição otimizada encontrada foi um tratamento com fluxo de oxigênio de 2 L/min por 35 minutos à 25°C. A amostra clareada na condição otimizada apresentou capacidade antioxidante maior que a amostra comercial, indicando que o processo de clareamento por ozonização pode ser menos prejudicial aos compostos bioativos. Além disso, os antioxidantes naturais presentes no alginato de sódio aqui estudado podem agregar valor aos produtos que utilizam esse composto em preparações alimentícias.

Palavras-chave: Ozônio. Otimização. Alginato. Alga Parda. Atividade Antioxidante.

YAMASHITA, Camila. **Effect of ozone application on the quality of alginate extracted from brown seaweeds (*Sargassum* spp.).** 2019. 58 f. Dissertation (Masters in Biosciences) – Sao Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2019.

ABSTRACT

Alginate is a polysaccharide which can be found in the cell wall of brown algae. Its original color is brown that is why a bleaching process is needed to improve this visual impairment. The ozone gas (O₃) has shown a great potential as a more sustainable bleaching agent. The present study aims the optimization of bleaching parameters (time, oxygen flow rate and temperature) of sodium alginate from brown seaweeds (*Sargassum* spp.) using ozone gas as the bleaching agent on the colorimetrics parameters (percent transmittance and index of luminosity), chemical composition (mannuronic (M) and guluronic (G) acid ratio M/G) and rheological properties (intrinsic viscosity, dynamic viscosity and molar mass). Once it was found the optimal conditions of bleaching, it was also verified the influence of ozonation on antioxidant activity of sodium alginate. The findings point out that ozonation time is the independent variable that most affects the responses, followed by the temperature and oxygen flow rate. The optimized bleaching conditions were determined with an oxygen flow rate at 2 L/min, during 35 min at 25°C. The bleached sample on the optimized conditions presented a higher antioxidant capacity than the commercial sodium alginate sample, highlighting that the discoloration by ozone might be less harmful to bioactive compounds. Besides, natural antioxidants of sodium alginate can add value to products that use this compound in food preparations.

Key-words: Ozone. Optimization. Alginate. Brown Seaweed. Antioxidant Activity.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO..... | 11 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 15 |
| | |
| Otimização do processo de clareamento de alginato de sódio extraído de alga parda utilizando superfície de resposta..... | 18 |
| RESUMO..... | 18 |
| INTRODUÇÃO..... | 19 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 21 |
| Coleta e secagem das macroalgas..... | 21 |
| Extração do alginato..... | 20 |
| Tratamentos de branqueamento do alginato..... | 22 |
| Tratamento com ozônio..... | 22 |
| Delineamento experimental..... | 22 |
| Análise dos dados..... | 23 |
| Determinação de parâmetros colorimétricos..... | 23 |
| Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) por Hidrogênio (H^1) | 24 |
| Caracterização reológica..... | 24 |
| Determinação da Viscosidade Intrínseca (μ_{int}) e Massa Molar (M_w) | 25 |
| Capacidade antioxidante..... | 26 |
| Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS ^{•+} | 26 |
| Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH [•] | 26 |
| Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno /ácido-linoleico..... | 27 |
| Análise estatística..... | 27 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 28 |
| Ajuste do modelo e análises estatísticas..... | 28 |
| Efeito da ozonização na cor do alginato..... | 33 |

| | |
|--|----|
| Porcentagem de transmitância..... | 34 |
| Índice de Luminosidade (L*)..... | 35 |
| Efeito dos parâmetros da ozonização na proporção M/G do alginato de sódio..... | 36 |
| Efeito dos parâmetros da ozonização na viscosidade dinâmica (μ_{din}) do alginato de sódio..... | 41 |
| Efeito dos parâmetros da ozonização na massa molar (M_v) e viscosidade intrínseca (μ) do alginato..... | 44 |
| Otimização e validação do processo de clareamento de alginato de sódio extraído de alga parda..... | 47 |
| Avaliação da capacidade antioxidante do alginato de sódio clareado sob as condições otimizadas..... | 48 |
| ABTS..... | 48 |
| DPPH..... | 49 |
| β -caroteno /ácido-linoleico..... | 50 |
| CONCLUSÃO..... | 52 |
| REFERÊNCIAS..... | 53 |

INTRODUÇÃO

A era industrial contemporânea se caracteriza pela necessidade de uma alta eficiência produtiva em curtos períodos, além de ser imprescindível a introdução de novas tecnologias que visam aumentar a lucratividade e, assim, obter uma diferença competitiva no mercado. Atualmente, nota-se uma tendência para inserção de um modelo mais sustentável nas três dimensões: social, econômica e ambiental, em que há uma responsabilidade pelos efeitos negativos gerados pela indústria. Nesse contexto, a biotecnologia (*bios-vida*; *technos-tecnologia*; *logos-conhecimento*) é considerada uma ferramenta essencial para evolução industrial no século XXI (KAFARSKI, 2012), proporcionando novas oportunidades para um sistema de produção mais sustentável de produtos e serviços (GAVRILESCU; CHISTI, 2005). Recursos biológicos presentes na fauna e flora de ecossistemas mundiais ainda são pouco investigados para descoberta de componentes com alto potencial de aplicabilidade em diversos segmentos industriais, como o farmacêutico e alimentício (GAVRILESCU; CHISTI, 2005). Por exemplo, a exploração de recursos de oceanos e mares para desenvolver produtos e aplicá-los industrialmente, com a utilização da biotecnologia azul (KAFARSKI, 2012).

As macroalgas ou algas marinhas representam um dos mais importantes organismos fotossintéticos em nosso planeta e estão se tornando fontes atrativas para utilização humana, uma vez que são abundantes no ambiente, apresentam altas taxas de crescimento e não necessitam de água potável e terras cultiváveis (LORBEER et al., 2015). Além disso, devido ao seu habitat com grande disponibilidade de luz e concentrações consideráveis de oxigênio e dióxido de carbono (RAYMUNDO et al., 2004), as algas desenvolveram mecanismos fisiológicos e biomoleculares de defesa contra os efeitos das espécies reativas do oxigênio, representando uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (ROCHA et al., 2007, FLEITA et al., 2015).

Um dos critérios de classificação das algas marinhas é de acordo com seu tipo de pigmento, sendo divididas em: Chlorophyceae (algas verdes), Rhodophyceae (algas vermelhas) e Phaeophyceae (algas pardas), que possuem como principais pigmentos as clorofilas a e b, fucoeritrina e fucoxantina, respectivamente. A cor das algas pardas também se deve à presença de polissacarídeos em sua estrutura, como as laminarinas,

fucanas e ácidos algínicos (HAUGAN, 1994; MCHUGH, 2003; ROBIC et al., 2009; O'SULLIVAN et al., 2010).

O alginato ou ácido algínico está presente na parede celular das algas marinhas pardas e também pode ser produzido por algumas bactérias (HAUGAN, 1994). Em 2016, o Brasil importou aproximadamente R\$ 35 milhões deste polissacarídeo principalmente do Chile, China e Noruega (Atlas of Economic Complexity, 2019), o que motiva estudos visando a sua produção nacional, tendo em vista a abundância de sua matéria-prima na costa marítima brasileira. A estrutura química, propriedades físico-químicas e atividades biológicas desse biopolímero têm sido amplamente estudadas (PENMAN; SANDERSON, 1972; GRASDALEN, 1983; MCHUGH et al., 2001; LARSEN et al., 2003; TORRES et al., 2007; FENORADOSOA et al., 2010; PEREZ et al., 2014; JENSEN, LARSEN; ENGELSEN, 2015; EL ATOUANI et al., 2016; FERTAH et al., 2017), com o intuito de obter novas fontes de compostos bioativos naturais.

Sua estrutura é linear não-ramificada composta por duas espécies de resíduos de ácidos urônicos, o ácido β -D-manurônico (M) e o seu epímero no C5 o α -L-gulurônico (G) unidos por ligações do tipo (1 \rightarrow 4). Esses resíduos são agrupados na forma de bloco de ácido gulurônico (G) ou ácido manurônico (M) que podem ser compostos por blocos homopoliméricos (GG ou MM) junto com blocos alternados (MG) na mesma molécula, o que determina as propriedades do ácido algínico (DRAGET, SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK, 2005) (Figura 1).

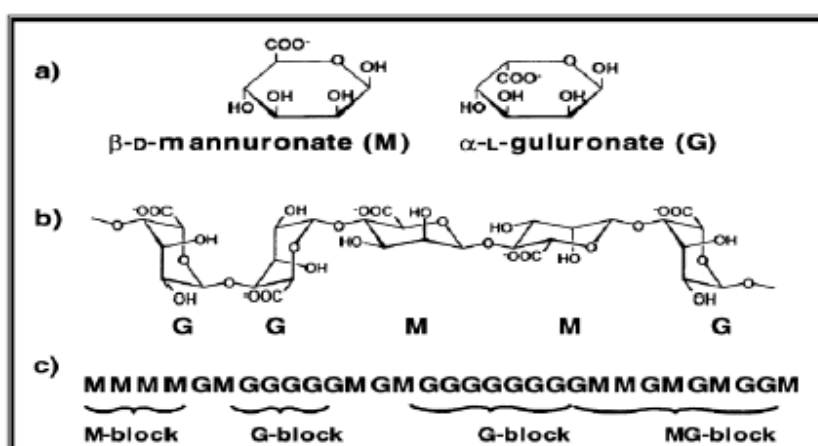


Figura 1. Características estruturais dos alginatos. a) monossacarídeos dos alginatos, b) conformação da cadeia e c) distribuição dos blocos (Draget, Smidsrød e Skjåk-bræk, 2005).

A coloração marrom original desse biopolímero extraído de algas pardas pode causar rejeição e insatisfação do mercado consumidor. Portanto, com o intuito de melhorar esta qualidade sensorial, é necessária a aplicação de agentes branqueadores, sendo o hipoclorito de sódio mais comumente utilizado nesta etapa. Entretanto, nos últimos anos, a utilização de hipoclorito e demais sais de cloro tem sido motivo de preocupação, pois esses compostos são considerados precursores na formação de cloraminas orgânicas, que são prejudiciais à saúde, devido ao alto potencial carcinogênico (MCNEAL et al., 1995; OLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009). Assim, na busca por um agente clarificante mais sustentável, o gás ozônio (O₃) tem mostrado grande potencial de aplicabilidade, já que tem sido utilizado para descolorir corantes (KHADHRAOUI et al., 2009; SANTANA et al., 2009; TREVIZANI, 2015; TORO, 2016) e no branqueamento do caldo de cana na indústria sucroalcooleira (FONSECA, 2017). Segundo os estudos de Lazarova et al. (1999), os custos operacionais e de investimento para aplicação de ozonização superam os de cloração, em contrapartida, a ozonização oferece maior segurança e menor produção de resíduos tóxicos e subprodutos. Desta forma, a utilização do ozônio vai ao encontro dos propósitos da biotecnologia branca na busca de um processo que concorra com tecnologias clássicas, apresentando processos mais ecologicamente corretos (KAFARSKI, 2011). Além disso, esse composto é considerado como GRAS (*General Recognized As Safe*), pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde a década de 90 (BOTELHO et al., 2011), possibilitando a aplicação direta em produtos alimentícios.

O ozônio é uma molécula formada por três átomos de oxigênio cuja estrutura e configuração eletrônica conferem uma alta reatividade (KHANDEGAR; SAROHA, 2013). A aplicação de ozônio oferece vantagens como degradação rápida a oxigênio e, após reagir com compostos orgânicos, seus subprodutos não são prejudiciais à saúde humana (PASCUAL et al., 2007).

Trabalhos avaliando a influência da aplicação de ozônio como agente clareador sobre o alginato são inexistentes, assim como são escassos estudos envolvendo macroalgas coletadas na costa marítima brasileira. Deste modo, o objetivo geral do presente estudo foi verificar o efeito da utilização do ozônio no clareamento do alginato de sódio extraído de algas pardas coletadas no litoral brasileiro. O trabalho foi dividido em dois capítulos, onde o Capítulo 1 visou a otimização, utilizando a análise de superfície de resposta, dos parâmetros de clareamento, utilizando ozônio como agente branqueador, de alginato de sódio proveniente da alga *Sargassum* spp., Enquanto que no Capítulo 2 foi

estudada a influência da ozonização sob a atividade antioxidante do alginato, obtido a partir das condições otimizadas de clareamento (Capítulo 1), visto que há uma vasta e potencial aplicação deste polissacarídeo em diferentes segmentos industriais, onde a cor tem grande impacto na qualidade do produto final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY. “Where did Brazil import alginic acid from in 2016?” 2019. Disponível em: <http://atlas.cid.harvard.edu/explore/?country=32&partner=undefined&product=6680&productClass=HS&startYear=undefined&target=Product&tradeDirection=import&year=2016>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- BOTELHO, S. S., DE MELLO LUVIELMO, M., CURTINOVI GEYER, M.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, 2011.
- DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginates from algae. **Biopolymers Online: Biology• Chemistry• Biotechnology• Applications**, v. 6, 2005.
- EL ATOUANI, S., BENTISS, F., REANI, A., ZRID, R., BELATTMANIA, Z., PEREIRA, L., MORTADI, A., CHERKAoui, O. & SABOUR, B. The invasive brown seaweed *Sargassum muticum* as new resource for alginate in Morocco: Spectroscopic and rheological characterization. **Phycological Research**, v. 64, n. 3, p. 185-193, 2016.
- 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**, v. 22, n. 2, p. 131-137, 2010.
- FERTAH, M., BELFKIRA, A., TAOURIRTE, M.; BROUILLETTE, F. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3707-S3714, 2017.
- 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.
- FONSECA, C. R. **Ozonização: uma alternativa para clarificação do caldo de cana-de-açúcar**. Dissertação (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 7-8, p. 471-499, 2005.
- GRASDALEN, H. High-field, ¹H-nmr spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. **Carbohydrate Research**, v. 118, p. 255-260, 1983.
- HAUGAN, J. A. Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 1, p. 31-41, 1994.

JENSEN, H. M.; LARSEN, F. H.; ENGELSEN, S. B. Characterization of alginates by nuclear magnetic resonance (NMR) and vibrational spectroscopy (IR, NIR, Raman) in combination with chemometrics. **Natural Products From Marine Algae**. Humana Press, New York, NY, p. 347-363, 2015.

KAFARSKI P.: Biała biotechnologia. W książce **Misja nauk chemicznych**. Ed. B. Marciniak, Wydawnictwo Nauka i Innowacje, Poznań 2011.

KAFARSKI, P. Rainbow code of biotechnology. **Chemik**, v. 66, n. 8, p. 811-6, 2012.

KHADHRAOUI, M., TRABELSI, H., KSIBI, M., BOUGUERRA, S.; ELLEUCH, B. Discoloration and detoxification of a Congo red dye solution by means of ozone treatment for a possible water reuse. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2-3, p. 974-981, 2009.

KHANDEGAR, V.; SAROHA, A. K. Electrocoagulation for the treatment of textile industry effluent—A review. **Journal of environmental management**, v. 128, p. 949-963, 2013.

LARSEN, B., SALEM, D. M. S. A., SALLAM, M. A. E., MISHRIKEY, M. M., BELTAGY, A. I. Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Seacoast. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2325–2336, 2003.

LAZAROVA, V.; SAVOYE, P.; JANEX, M. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. **Water Science Technology**, London, v. 40, n. 4-5, p. 201-213, 1999

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.

MCHUGH, D. J., HERNÁNDEZ-CARMONA, G., ARVIZU-HIGUERA, D. L., & RODRÍGUEZ-MONTESINOS, Y. E. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. **Journal of applied phycology**, v. 13, n. 6, p. 471-479, 2001.

MCHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry. **Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2003.

MCNEAL, T. P.; HOLLIFIELD, H. C.; DIACHENKO, G. W. Survey of trihalomethanes and other volatile chemical contaminants in processed foods by purge-and-trap capillary gas chromatography with mass selective detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International**, v. 78, n. 2, p. 391-397, 1995.

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 686-693, 2009.

O'SULLIVAN, L., MURPHY, B., MCLOUGHLIN, P., DUGGAN, P., LAWLOR, P. G., HUGHES, H.; GARDINER, G. E. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. **Marine drugs**, v. 8, n. 7, p. 2038-2064, 2010.

PASCUAL, A.; LLORCA, L; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p. S29-S35, 2007.

PENMAN, A.; SANDERSON, G. R. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. **Carbohydrate Research**, v. 25, n. 2, p. 273-282, 1972.

PEREZ, R. A.; KIM, M.; KIM, T. H.; KIM, J. H.; LEE, J. H.; PARK, J. H.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. W. Utilizing core-shell fibrous collagen-alginate hydrogel cell delivery system for bone tissue engineering. **Tissue engineering: Part A**, v. 20, n.1-2, p. 103-114, 2014.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, p. 495-503, 2004.

ROBIC, A., GAILLARD, C., SASSI, J. F., LERAT, Y.; LAHAYE, M. Ultrastructure of ulvan: a polysaccharide from green seaweeds. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 91, n. 8, p. 652-664, 2009.

ROCHA, F. D., PEREIRA, R. C., KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, p. 631-639, 2007.

SANTANA, M. H., DA SILVA, L. M., FREITAS, A. C., BOODTS, J. F., FERNANDES, K. C.; DE FARIA, L. A. Application of electrochemically generated ozone to the discoloration and degradation of solutions containing the dye Reactive Orange 122. **Journal of Hazardous materials**, v. 164, n. 1, p. 10-17, 2009.

TORO, C. A. T. **Estudo da descoloração do corante alimentício amarelo crepúsculo por meio da ozonização (Catalítica)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

TORRES, M. R.; SOUSA, A. P. A.; SILVA FILHO, E. A. T.; MELO, D. F., FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M.; LIMA, M. G. S. Extraction and physicochemical characterization of Sargassum vulgare alginate from Brazil. **Carbohydrate Research**, v.342, p.2067-2074, 2007.

TREVIZANI, J. L. B. **Descoloração e degradação do azo corante vermelho BR por ozonização**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE CLAREAMENTO DE ALGINATO DE SÓDIO EXTRAÍDO DE ALGA PARDA UTILIZANDO SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

RESUMO

As algas marinhas têm sido estudadas devido aos biocompostos nela encontrados, como também por sua alta disponibilidade no meio ambiente. O alginato é um polissacarídeo de destaque encontrado em algas pardas do gênero *Sargassum* spp. Porém, sua coloração marrom prejudica sensorialmente sua aceitação pelo mercado consumidor, sendo necessário um tratamento com agentes branqueadores. O gás ozônio tem mostrado grande potencial na remoção de cores de efluentes e corantes; além de não gerar resíduos tóxicos, sendo mais sustentável que o agente branqueador mais comumente utilizado, o hipoclorito de sódio. Assim, foi realizada a otimização de três parâmetros (tempo, fluxo de oxigênio e temperatura) do clareamento da solução de alginato por ozonização, por um delineamento experimental do tipo Box-Behnken, sobre as respostas de porcentagem de transmitância, índice de luminosidade, razão entre os ácidos manurônico (M) e gulurônico (G) M/G, viscosidade dinâmica, massa molar e viscosidade intrínseca. O tempo é a variável independente que tem maior influência nas respostas, seguido da temperatura e fluxo de oxigênio. A condição otimizada encontrada foi o tratamento com 35 minutos de exposição ao gás ozônio com fluxo de oxigênio à 2L/min mantidos à 25°C. Nas análises de capacidade antioxidante, a solução de alginato de sódio clareada na condição otimizada, apresentou maiores valores que a amostra de alginato de sódio comercial, indicando que o processo de clareamento por ozonização pode ser menos prejudicial aos compostos bioativos, além de agregar valor aos produtos que utilizam esse composto em preparações alimentícias.

Palavras-chave: Delineamento experimental. *Sargassum*. Ozônio. Descoloração. Box-Behnken. Atividade Antioxidante.

1. Introdução

As algas marinhas estão se tornando fontes atrativas para utilização humana, uma vez que são abundantes no ambiente, apresentam altas taxas de crescimento e não necessitam de água potável e terras cultiváveis (Lorbeer et al., 2015).

Nas últimas décadas, polissacarídeos isolados de várias fontes (animais, plantas e microorganismos) têm sido aplicados em diversos segmentos industriais como alimentícia, cosmética e farmacêutica devido ao amplo espectro de atividades biológicas e baixa toxicidade relativa (Fleita El-Sayed & Rifaat, 2015). Nas algas marinhas, os polissacarídeos são encontrados principalmente na classe Phaeophyta, mais conhecidas como algas pardas e principal fonte dos alginatos comerciais (Rhein-Knudsen et al., 2017). As espécies mais importantes de algas pardas para extração de alginato são *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria* spp., *Ascophyllum nodosum* e *Sargassum* spp (Gates, 2012).

A estrutura do alginato é linear não-ramificada composta por duas espécies de resíduos de ácidos urônicos, o ácido β -D-manurônico (M) e o seu epímero no C5 o α -L-gulurônico (G), unidos por ligações do tipo (1 \rightarrow 4). Esses resíduos são agrupados em blocos homopoliméricos (GG ou MM) juntamente com blocos alternados (MG) na mesma molécula (Draget, Smidsrød & Skjåk-bræk, 2005). A razão M/G e a distribuição dos monossacarídeos podem variar entre as espécies de alga parda e esses são os principais parâmetros utilizados para avaliar as propriedades químicas e reológicas do alginato (Andriamanantoanina & Rinaudo, 2010; Cong et al., 2014).

Devido ao seu habitat com grande disponibilidade de luz e concentrações consideráveis de oxigênio e dióxido de carbono (Raymundo, Horta & Fett, 2004), as algas marinhas desenvolveram mecanismos fisiológicos para produção de metabólitos secundários contra os efeitos das espécies reativas do oxigênio, representando uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais (Batista et al., 2009; Fleita El-Sayed & Rifaat, 2015; Rocha et al., 2007).

Os antioxidantes naturais são compostos que tem atraído interesse da indústria e podem substituir os sintéticos no prolongamento da vida útil de produtos, retardando o processo de oxidação. Eles também podem atribuir propriedades valiosas para o produto, agindo contra doenças associadas à oxidação, envelhecimento e exposição aos raios UV

(Balboa et al., 2013). Além disso, produtos naturais são geralmente mais seguros que os sintéticos pela ausência de contaminação química e melhor aceitos pelos setores industriais e consumidores (Heo et al., 2005; Patra et al., 2008).

A coloração marrom original desse biopolímero extraído de algas pardas pode causar rejeição e insatisfação do mercado consumidor. Portanto, com o intuito de melhorar esta qualidade sensorial, é necessária a aplicação de agentes branqueadores, sendo o hipoclorito de sódio mais comumente utilizado nesta etapa. Entretanto, nos últimos anos, a utilização de hipoclorito e demais sais de cloro tem sido motivo de preocupação, pois esses compostos são considerados precursores na formação de cloraminas orgânicas, que são prejudiciais à saúde devido ao alto potencial carcinogênico (Filho & Sakaguti, 2008; McNeal, Hollifield & Diachenko, 1995; Olmez & Kretzschmar, 2009).

Assim, na busca por um agente clarificante mais sustentável, o gás ozônio (O₃) mostrou um grande potencial de aplicabilidade, uma vez que já tem sido estudado para descolorir corantes e caldo de cana (Khadhraoui et al., 2009; Santana et al., 2009; Silva, Sartori & Aguiar, 2015; Tosik & Wiktorowski, 2001; Turhan et al., 2012). Além disso, esse composto é considerado como GRAS (*General Recognized As Safe*) no uso para processamento de alimentos, pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 1997 (O'Donnell et al., 2012) e não gera resíduos tóxicos (Pascual, Llorca & Canut, 2007).

Diversos fatores como o fluxo do gás de alimentação, temperatura, tempo de tratamento e concentração de ozônio podem afetar a eficiência do clareamento por ozonização (Guzel-Seydim, Greene & Seydim, 2004; Tiwari et al., 2008; Tiwari et al., 2009). Assim, é necessário um ajuste máximo na otimização do clareamento de alginato de sódio extraído de algas pardas. A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma ferramenta matemática e estatística muito útil pois, através dela, obtêm-se condições otimizadas considerando um sistema multivariável de um delineamento experimental (Bezerra et al., 2008; Ferreira et al., 2007; Jeong et al., 2014; Lee et al., 2016).

As algas marinhas do gênero *Sargassum* são abundantes na costa marítima brasileira e ainda pouco estudadas. Em 2016, o Brasil importou aproximadamente R\$ 35 milhões de ácido algínico ou alginato principalmente do Chile, China e Noruega (Atlas of Economic Complexity, 2019), o que motiva estudos visando a sua produção nacional, tendo em vista a abundância de sua matéria-prima na costa marítima brasileira. O objetivo

do presente estudo foi investigar o impacto do fluxo do gás de alimentação, temperatura e tempo de exposição ao ozônio sobre os parâmetros colorimétricos, composição química e propriedades reológicas do alginato de sódio extraído de algas pardas (*Sargassum* spp.). O delineamento Box Behnken (BBD) e MSR foram aplicados aos experimentos para obter maior quantidade de dados exigindo menor tempo e recursos (Bidin et al., 2009). Após a otimização dos parâmetros de clareamento, foi avaliada sua capacidade antioxidante.

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta e secagem das macroalgas

As algas do gênero *Sargassum* foram coletadas no litoral do Estado de São Paulo, na Praia Grande em Ubatuba. O material coletado foi acondicionado em frascos com água do mar e transportado sob baixa temperatura. Primeiramente foi realizada a triagem das algas em água corrente, separando-as de quaisquer organismos exógenos. Após limpeza prévia, estas foram sanitizadas com água clorada (25 ppm) durante 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado, para retirada do excesso de água, e seco em estufa com circulação de ar a 45 °C por 12 horas. O produto desidratado foi reduzido a pó, em moinho de facas, acondicionado em embalagens laminadas e mantidas à temperatura ambiente.

2.2. Extração do alginato

O processo de extração do alginato de sódio foi realizado segundo a metodologia modificada de McHugh et al. (2001), com os parâmetros otimizados por Lorbeer et al. (2015) e Nogueira (2017) nas etapas de tratamento ácido e básico, respectivamente. Para cada tratamento, 6 g de alga em pó foram imersas em etanol e agitadas em shaker orbital por 3 horas em temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido duas vezes, possibilitando a retirada dos compostos fenólicos e proteínas. Posteriormente, a alga foi seca durante a noite em estufa a 40°C e, o produto seco, submetido ao tratamento ácido, que consistiu na adição de água destilada e ácido clorídrico 0,1 M, até atingir pH 2,0. A mistura foi agitada a 250 rpm por 110 minutos à 45°C. As amostras foram lavadas com

água destilada e a estas foi adicionado carbonato de sódio 2%, até atingir pH 10 e mantidas por 90 minutos à 75,7 °C, sob agitação com agitador magnético. A solução foi filtrada à vácuo até a retirada das impurezas. Para a separação do alginato de sódio, foi adicionado etanol (1:2, v/v) ao filtrado, precipitando o produto desejado, que foi separado por centrifugação e seco em estufa à 45°C por 12 horas, para a obtenção do alginato de sódio.

2.3. Tratamentos de branqueamento do alginato

2.3.1. Tratamento com ozônio

O clareamento da solução 1% (m/v) de alginato de sódio, extraído da alga parda *Sargassum*, foi realizado através da aplicação do gás ozônio. A solução foi inserida em uma coluna de 500 mL, sendo utilizado metade do volume total em cada reação de ozonização. O gás ozônio, obtido pela conversão do oxigênio (O₂) em ozônio (O₃) através do gerador de ozônio (Modelo GOBSUS, OzônioBras, Araçatuba, Brasil), foi liberado na solução de alginato de sódio através de um difusor com o tempo monitorado pelo equipamento. A vazão do gás de alimentação (oxigênio) foi controlada por um regulador de pressão de gás e a temperatura da solução de alginato durante a reação de ozonização foi controlada através de uma camisa térmica para circulação de água ligada a um banho termostático.

2.3.2. Delineamento experimental

A metodologia de Superfície de Resposta, utilizando o delineamento experimental Box-Behnken (BBD), foi escolhida para avaliar e otimizar a influência dos parâmetros de clareamento por ozonização de soluções 1% (m/v) de alginato de sódio. As variáveis independentes do delineamento foram tempo de ozonização (X₁), entrada de fluxo de oxigênio (X₂) e temperatura de aplicação (X₃) que foram examinados em três níveis, sendo codificados como -1, 0 e +1. As variáveis dependentes foram cor, razão M/G, massa molar e viscosidades dinâmica e intrínseca. O delineamento totalizou quinze pontos experimentais, incluindo três replicatas dos pontos centrais, além da amostra controle que consistiu no alginato de sódio extraído da alga parda sem tratamento de clareamento por ozonização (Tabela 1). Os limites das variáveis independentes foram

definidos a partir de estudos prévios utilizando ozônio (Fonseca, 2017; Sartori et al., 2017; Tiwari et al., 2008; Tiwari et al., 2009; Toro, 2016).

2.4 Análise dos dados

As análises do delineamento experimental e os cálculos das respostas previstas foram realizadas utilizando o *software* DESIGN EXPERT 11 (StatEaseInc. Minneapolis, USA). O delineamento utilizado permite um ajuste máximo com o modelo quadrático (Eq 1), podendo o modelo de primeira ordem (Eq 2) também ser utilizado para prever as respostas observadas (cor, viscosidade dinâmica, razão M/G, massa molar e viscosidade intrínseca) em função dos parâmetros de clareamento.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq 3} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 \quad (2)$$

Onde Y é a resposta prevista; X_i e X_j são as variáveis independentes codificadas; β_0 é a intercepção (coeficiente de regressão do modelo); β_i , β_{ii} e β_{ij} são coeficientes lineares, quadráticos e de interação, respectivamente.

A significância estatística dos coeficientes da equação ($p < 0,05$) foi avaliada pela análise da variância (ANOVA) e a qualidade do ajuste do modelo polinomial aos dados experimentais foi fornecido pelo coeficiente de determinação (R^2) e sua significância pelo teste F. A otimização dos melhores parâmetros para um processo de clareamento mais eficiente foi obtida utilizando a função de desejabilidade.

2.5. Determinação de parâmetros colorimétricos

A comparação colorimétrica dos alginatos de sódio tratados e controle foi determinada por dois métodos. O primeiro consistiu na análise da cor das soluções de alginato 1% logo após o clareamento por ozonização, em que as soluções foram previamente centrifugadas, para remover qualquer turbidez, e a cor do sobrenadante mensurada em porcentagem de transmitância em espectrofotômetro à 510 nm (McHugh

et al., 2001). No segundo método, a cor das amostras em pó foi determinada em colorímetro (HunterLab MiniScan EZ, Reston, USA) após liofilização. As medidas de cor foram realizadas em replicata, com três leituras para cada repetição, e expressas como índice de luminosidade L^* [0 (preto) a 100 (branco)].

2.6. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) por Hidrogênio (H^1)

A composição química dos alginatos foi obtida por RMN H^1 realizadas em parceria com o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). Os espectros foram obtidos utilizando o espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance III operando à 400 MHz. As amostras foram previamente solubilizadas em D_2O (óxido de deutério) e analisadas à 80 °C, sendo utilizado como referência interna trimetilsililpropionato de sódio deuterado (TSP-d4). Os dados obtidos foram analisados com auxílio do *software* TopSpin 3.6.0.

2.7. Caracterização reológica

A avaliação reológica das soluções 1% de alginato (m/v) foi realizada em reômetro rotacional de cilindros concêntricos (modelo AR2000, TA Instruments) à 25 °C. As curvas de fluxo, as quais relacionam tensão de cisalhamento e taxa de deformação, foram determinadas no intervalo de 0,01 a 300 s^{-1} . Os dados experimentais foram ajustados às equações matemáticas para avaliação do comportamento do fluido: newtoniano (Eq 3) ou não-newtoniano (Eq 4).

$$\tau = \mu_{din} \cdot \gamma \quad (3)$$

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad (4)$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), μ_{din} é a viscosidade dinâmica (Pa.s), γ é a taxa de deformação (s^{-1}), k é o índice de consistência (Pa s^n) e n é o índice do comportamento do fluido (adimensional).

2.8. Determinação da Viscosidade Intrínseca $[\eta]$ e Massa Molar (M_v)

Para a determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$, as amostras de alginato foram diluídas em NaCl 0,1 mol/L, em concentrações que variaram de 0,1 a 0,5 g/dL. Os ensaios foram realizados em um viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske de fluxo reverso, mantido em banho termostático à 25 °C, sendo registrado o tempo de escoamento para a solução percorrer o equipamento.

Para o cálculo da viscosidade intrínseca, primeiramente foram determinadas as viscosidades relativa (μ_r) (Eq 5), específica (μ_{esp}) (Eq 6) e específica reduzida ($\mu_{esp,red}$) (Eq 7). Assim, a viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi determinada pela extrapolação da curva $\mu_{esp,red}$ x concentração (C) até zero (Eq 8), verificando o valor no qual o eixo foi interceptado (Canevarolo, 2002).

$$\mu_r = \frac{t}{t_0} \quad (5)$$

$$\mu_{esp} = \mu_r - 1 \quad (6)$$

$$\mu_{esp,red} = \frac{\mu_{esp}}{C} \quad (7)$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \mu_{esp,red} \quad (8)$$

Onde μ_r é a viscosidade relativa (adimensional), μ_{esp} é a viscosidade específica (adimensional), $\mu_{esp,red}$ é a viscosidade específica reduzida (dL/g), $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (dL/g), t é o tempo de escoamento da solução no viscosímetro (s), t_0 é o tempo de escoamento do solvente no viscosímetro (s) e C é a concentração do alginato na solução (g/dL).

Os métodos viscosimétricos também permitem estimar os valores de massa molar de um determinado polímero pela aplicação da equação de Mark-Houwink (Eq 9). Os valores das constantes da equação foram propostos por Clementi et al. (1998) para prever as massas molares viscosimétricas de alginatos de diferentes fontes ($K = 0,023$ dL/g e $a = 0,984$), os quais também foram utilizados para determinação da massa molar de algas marrons do gênero *Sargassum vulgare* (Torres et al., 2007).

$$[\eta] = K (M_v)^a \quad (9)$$

Onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, K e a são constantes dependentes do tipo de polímero, solvente e temperatura e M_v é a massa molar viscosimétrica do polímero (kDaltons).

2.9. Capacidade antioxidante

Após a análise dos dados do delineamento experimental, o alginato de sódio clareado na condição otimizada teve sua capacidade antioxidante avaliada por três metodologias.

2.9.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante do alginato de sódio em pó foi avaliada utilizando o radical ABTS (2,2' - azino -bis (ácido 3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfônico), conforme Rufino et al. (2010). A solução de radical ABTS (Sigma - Aldrich) foi preparada a partir da reação da solução de ABTS (7 mM) com a solução de persulfato de potássio (140 mM, Sigma - Aldrich). Uma alíquota de trinta microlitros (30 μ L) de cada amostra, em quatro diluições diferentes (2 - 8 g/L), e em triplicata, foi transferida para tubos de ensaio e misturada com 3,0 mL da solução de radical ABTS. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro à 734 nm após 6 minutos da adição do radical ABTS nas amostras. Os resultados foram interpolados com uma curva padrão preparada com Trolox e expressos em μ M equivalente Trolox (TE) por g de pó de alga (μ M TE / g).

2.9.2. Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH[•]

A atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH foi determinada segundo Kirby & Schmidt (1997), com algumas modificações. Solução de alginato de sódio (500 μ L), em diferentes concentrações (0,5-1500 μ g/mL), foi adicionada à 375 μ L de etanol 99% e 125 μ L de solução de DPPH (0,02%(m/v) em etanol). A mistura foi incubada por 60 min no escuro à temperatura ambiente. A capacidade de sequestro do radical foi medida à 517 nm e os resultados expressos em porcentagem (Eq 10).

$$\text{Atividade de sequestro do radical DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}} + A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (10)$$

Onde A_{controle} é a absorvância da reação de controle (contendo todos os reagentes exceto a amostra), A_{branco} é a absorvância da solução de alginato de sódio (contendo todos os reagentes exceto a solução de DPPH) e A_{amostra} é a absorvância da solução de alginato de sódio com a solução de DPPH.

2.9.3. Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno /ácido-linoleico

A medida da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi determinada segundo Koleva et al. (2002). Uma mistura de β -caroteno/ácido linoleico foi preparada dissolvendo 0,5 mg de β -caroteno, 25 μL de ácido linoleico e 200 μL de Tween 80 em 1 mL de clorofórmio, sendo este último retirado em rotaevaporador (TE-211, Tecnal) à 40° C. Em seguida, água destilada (100 mL) foi adicionada e a mistura foi agitada vigorosamente, sendo que essa emulsão obtida foi previamente preparada antes de cada experimento. Alíquotas (2,5 mL) de emulsão de β -caroteno/ácido linoleico foram transferidas para tubos contendo solução de alginato (0,2 mL) à diferentes concentrações (0,05-1,5 mg/mL) então, a mistura foi incubada por 2 h à 50 °C e a absorvância medida à 470 nm. A amostra controle continha apenas a emulsão. A capacidade antioxidante do alginato clareado por ozonização, pelo β -caroteno foi expressa em porcentagem e calculada através da Eq 11.

$$\text{Inibição do clareamento de } \beta\text{-caroteno (\%)} = \left[1 - \left(\frac{A_0 - A_t}{A'_0 - A'_t} \right) \right] \times 100 \quad (11)$$

Onde A_0 e A'_0 são as absorvâncias da amostra e do controle, respectivamente, medidas no tempo zero, e A_t e A'_t são as absorvâncias da amostra e do controle, respectivamente, medidas após 2 h.

2.10. Análise estatística

Os resultados, em triplicata, foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para verificar se houve diferença significativa entre as amostras ao nível de 95% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Microcal TM Origin [®] 6.0 (Microcal, Northampton, MA, USA).

3. Resultados e discussão

3.1. Ajuste do modelo e análises estatísticas

O delineamento de Box-Behnken com três fatores e três níveis foi empregado para avaliar o efeito da ozonização no clareamento da solução de alginato de sódio (Figura 2), através da avaliação das propriedades físico-químicas (%T, L^* , μ_{din} , Mv , M/G e η). Na Figura 3 é apresentado o alginato de sódio liofilizado, após os diferentes tratamentos de clareamento. Os valores das respostas (Tabela 1) variaram conforme a condição de ozonização e se ajustaram ao modelo polinomial de segunda ordem (Eq 1), exceto o índice de luminosidade L^* que melhor se ajustou à regressão de primeira ordem (Eq 2). A validação dos modelos, os quais relacionam cada resposta e as variáveis independentes, foi confirmada pelo teste de perda de ajuste e sua significância, assim como pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 2). A importância de cada coeficiente da equação foi determinada pelos valores de F e p (Liu et al., 2012), sendo que valores de p menores que 0,05 indicam que o termo é significativo.

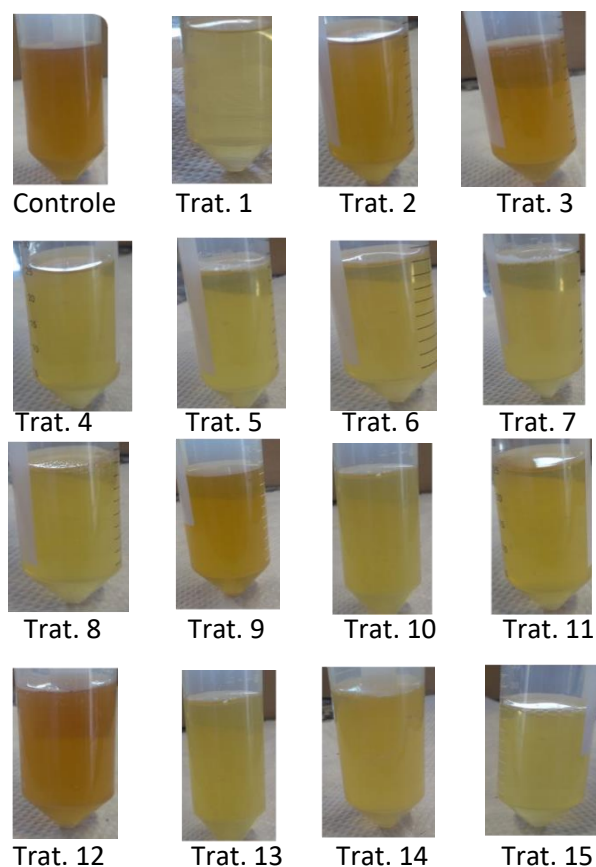


Figura 2. Tratamentos das soluções de alginato de sódio 1% após o processo de clareamento por ozonização.



Figura 3. Tratamentos de clareamento por ozonização das soluções de alginato de sódio após liofilização.

Tabela 1 Delineamento experimental de Box-Behnken para as variáveis independentes e suas respostas.

| Tratamentos | Variáveis codificadas | | | Valores reais | | | Respostas | | | | | |
|-------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------|---------------------------------|------------------|-----------|-------|------|--------------------------|----------|------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Tempo (min) | Fluxo de O ₂ (L/min) | Temperatura (°C) | % T | L* | M/G | μ _{dim} (mPa.s) | Mv (kDa) | [η] (dL/g) |
| 1 | +1 | +1 | 0 | 35 | 2,0 | 25 | 83,6 | 76,29 | 0,69 | 1,68 | 63,57 | 1,37 |
| 2 | +1 | 0 | +1 | 35 | 1,5 | 45 | 57,5 | 62,24 | 0,67 | 1,58 | 26,11 | 0,57 |
| 3 | +1 | 0 | -1 | 35 | 1,5 | 5 | 58,7 | 66,27 | 0,66 | 1,66 | 71,69 | 1,54 |
| 4 | +1 | -1 | 0 | 35 | 1,0 | 25 | 75,1 | 71,47 | 0,64 | 1,53 | 70,76 | 1,52 |
| 5 | 0 | +1 | +1 | 20 | 2,0 | 45 | 56,6 | 60,14 | 0,64 | 1,62 | 39,00 | 0,85 |
| 6 | 0 | +1 | -1 | 20 | 2,0 | 5 | 59,1 | 65,32 | 0,68 | 1,69 | 73,59 | 1,58 |
| 7 | 0 | -1 | +1 | 20 | 1,0 | 45 | 55,7 | 64,23 | 0,66 | 1,67 | 27,00 | 0,59 |
| 8 | 0 | -1 | -1 | 20 | 1,0 | 5 | 57,1 | 61,25 | 0,67 | 1,61 | 34,17 | 0,74 |
| 9 | -1 | +1 | 0 | 5 | 2,0 | 25 | 40,8 | 53,42 | 0,74 | 3,15 | 57,94 | 1,25 |
| 10 | -1 | 0 | +1 | 5 | 1,5 | 45 | 44,1 | 54,56 | 0,68 | 2,45 | 27,31 | 0,59 |
| 11 | -1 | -1 | 0 | 5 | 1,0 | 25 | 37,5 | 48,36 | 0,71 | 3,80 | 53,79 | 1,16 |
| 12 | -1 | 0 | -1 | 5 | 1,5 | 5 | 40,8 | 54,68 | 0,75 | 3,03 | 46,14 | 1,00 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 20 | 1,5 | 25 | 75,3 | 70,70 | 0,71 | 2,07 | 24,62 | 0,54 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 20 | 1,5 | 25 | 81,3 | 75,97 | 0,73 | 1,93 | 20,29 | 0,44 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 20 | 1,5 | 25 | 77,6 | 70,15 | 0,71 | 1,58 | 19,41 | 0,42 |
| Controle | - | - | - | - | - | - | 29,4 | 48,67 | 0,74 | 5,62 | 139,51 | 2,96 |

Tabela 2

Coeficientes de regressão e análise da variância do modelo predito para cada resposta.

(Continua)

| Tipo | Soma dos quadrados | gl | Quadrado médio | Valor- F | Valor-p |
|---|--------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------|----------------|
| [%T] | | | | | |
| <i>Modelo</i> | 2991,94 | 9 | 332,44 | 4,98 | 0,0460* |
| X ₁ -Tempo | 1559,61 | 1 | 1559,61 | 23,34 | 0,0048* |
| X ₂ -Fluxo de O ₂ | 27,01 | 1 | 27,01 | 0,4043 | 0,5529 |
| X ₃ -Temperatura | 0,4050 | 1 | 0,4050 | 0,0061 | 0,9410 |
| X ₁ X ₂ | 6,76 | 1 | 6,76 | 0,1012 | 0,7633 |
| X ₁ X ₃ | 5,06 | 1 | 5,06 | 0,0758 | 0,7941 |
| X ₂ X ₃ | 0,3025 | 1 | 0,3025 | 0,0045 | 0,9490 |
| X ₁ ² | 608,10 | 1 | 608,10 | 9,10 | 0,0295* |
| X ₂ ² | 132,19 | 1 | 132,19 | 1,98 | 0,2186 |
| X ₃ ² | 826,16 | 1 | 826,16 | 12,36 | 0,0170* |
| <i>Residual</i> | 334,08 | 5 | 66,82 | | |
| Perda do ajuste | 315,75 | 3 | 105,25 | 11,49 | 0,0811 |
| Erro puro | 18,33 | 2 | 9,16 | | |
| Total | 3326,02 | 14 | | | |
| R ² =0,899 | R ² ajustado=0,7188 | | | | |
| [L*] | | | | | |
| <i>Modelo</i> | 549,39 | 3 | 183,13 | 5,92 | 0,0117* |
| X ₁ -Tempo | 532,20 | 1 | 532,20 | 17,21 | 0,0016* |
| X ₂ -Fluxo de O ₂ | 12,15 | 1 | 12,15 | 0,3929 | 0,5436 |
| X ₃ -Temperatura | 5,04 | 1 | 5,04 | 0,1630 | 0,6942 |
| <i>Residual</i> | 340,21 | 11 | 30,93 | | |
| Perda de ajuste | 340,06 | 9 | 37,78 | 487,54 | 0,0020* |
| Erro puro | 0,1550 | 2 | 0,0775 | | |
| Total | 889,60 | 14 | | | |
| R ² =0,618 | R ² ajustado=0,5133 | | | | |
| [M/G] | | | | | |
| <i>Modelo</i> | 0,0154 | 9 | 0,0017 | 6,36 | 0,0278* |
| X ₁ -Tempo | 0,0060 | 1 | 0,0060 | 22,55 | 0,0051* |
| X ₂ -Fluxo de O ₂ | 0,0006 | 1 | 0,0006 | 2,28 | 0,1912 |
| X ₃ -Temperatura | 0,0015 | 1 | 0,0015 | 5,64 | 0,0636 |
| X ₁ X ₂ | 0,0001 | 1 | 0,0001 | 0,3727 | 0,5682 |
| X ₁ X ₃ | 0,0016 | 1 | 0,0016 | 5,96 | 0,0585 |
| X ₂ X ₃ | 0,0002 | 1 | 0,0002 | 0,8385 | 0,4018 |
| X ₁ ² | 0,0000 | 1 | 0,0000 | 0,1171 | 0,7462 |
| X ₂ ² | 0,0022 | 1 | 0,0022 | 8,32 | 0,0344* |
| X ₃ ² | 0,0032 | 1 | 0,0032 | 12,04 | 0,0178* |

Tabela 2

Coeficientes de regressão e análise da variância do modelo predito.

(Continuação)

| Tipo | Soma dos quadrados | gl | Quadrado médio | Valor- F | Valor-p |
|---|---------------------------|-----------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Perda de ajuste | 0,0011 | 3 | 0,0004 | 2,69 | 0,2828 |
| Erro puro | 0,0003 | 2 | 0,0001 | | |
| Total | 0,0167 | 14 | | | |
| $R^2=0,919$ | R^2 ajustado=0,7750 | | | | |
| [μ_{din}] | | | | | |
| <i>Modelo</i> | 6,559E-06 | 9 | 7,288E-07 | 7,34 | 0,0205* |
| X ₁ -Tempo | 4,470E-06 | 1 | 4,470E-06 | 45,01 | 0,0011* |
| X ₂ -Fluxo de O ₂ | 2,761E-08 | 1 | 2,761E-08 | 0,2780 | 0,6205 |
| X ₃ -Temperatura | 5,611E-08 | 1 | 5,611E-08 | 0,5650 | 0,4861 |
| X ₁ X ₂ | 1,600E-07 | 1 | 1,600E-07 | 1,61 | 0,2602 |
| X ₁ X ₃ | 6,250E-08 | 1 | 6,250E-08 | 0,6293 | 0,4636 |
| X ₂ X ₃ | 4,225E-09 | 1 | 4,225E-09 | 0,0425 | 0,8447 |
| X ₁ ² | 1,357E-06 | 1 | 1,357E-06 | 13,66 | 0,0141* |
| X ₂ ² | 2,008E-08 | 1 | 2,008E-08 | 0,2022 | 0,6718 |
| X ₃ ² | 3,025E-07 | 1 | 3,025E-07 | 3,05 | 0,1414 |
| <i>Residual</i> | 4,966E-07 | 5 | 9,932E-08 | | |
| Perda de ajuste | 3,692E-07 | 3 | 1,231E-07 | 1,93 | 0,3590 |
| Erro puro | 1,274E-07 | 2 | 6,370E-08 | | |
| Total | 7,055E-06 | 14 | | | |
| $R^2=0,929$ | R^2 ajustado=0,8029 | | | | |
| [Mv] | | | | | |
| <i>Modelo</i> | 5135,57 | 9 | 570,62 | 6,33 | 0,0280* |
| X ₁ -Tempo | 275,54 | 1 | 275,54 | 3,06 | 0,1409 |
| X ₂ -Fluxo de O ₂ | 292,58 | 1 | 292,58 | 3,25 | 0,1315 |
| X ₃ -Temperatura | 1409,01 | 1 | 1409,01 | 15,63 | 0,0108* |
| X ₁ X ₂ | 32,15 | 1 | 32,15 | 0,3566 | 0,5764 |
| X ₁ X ₃ | 178,89 | 1 | 178,89 | 1,98 | 0,2180 |
| X ₂ X ₃ | 187,96 | 1 | 187,96 | 2,08 | 0,2084 |
| X ₁ ² | 1436,40 | 1 | 1436,40 | 15,93 | 0,0104* |
| X ₂ ² | 1529,26 | 1 | 1529,26 | 16,96 | 0,0092* |
| X ₃ ² | 10,04 | 1 | 10,04 | 0,1113 | 0,7522 |
| <i>Residual</i> | 450,80 | 5 | 90,16 | | |
| Perda de ajuste | 435,25 | 3 | 145,08 | 18,65 | 0,0513 |
| Erro puro | 15,56 | 2 | 7,78 | | |
| Total | 5586,37 | 14 | | | |
| $R^2=0,919$ | R^2 ajustado=0,7740 | | | | |

Tabela 2

Coeficientes de regressão e análise da variância do modelo predito.

(Conclusão)

| Tipo | Soma dos quadrados | gl | Quadrado médio | Valor- F | Valor-p |
|---|---------------------------------|----|----------------|----------|---------|
| [μ] | | | | | |
| <i>Modelo</i> | 2,34 | 9 | 0,2601 | 6,26 | 0,0287* |
| X ₁ -Tempo | 0,1250 | 1 | 0,1250 | 3,01 | 0,1435 |
| X ₂ -Fluxo de O ₂ | 0,1352 | 1 | 0,1352 | 3,25 | 0,1312 |
| X ₃ -Temperatura | 0,6385 | 1 | 0,6385 | 15,35 | 0,0112* |
| X ₁ X ₂ | 0,0144 | 1 | 0,0144 | 0,3463 | 0,5818 |
| X ₁ X ₃ | 0,0784 | 1 | 0,0784 | 1,89 | 0,2281 |
| X ₂ X ₃ | 0,0841 | 1 | 0,0841 | 2,02 | 0,2143 |
| X ₁ ² | 0,6565 | 1 | 0,6565 | 15,79 | 0,0106* |
| X ₂ ² | 0,7040 | 1 | 0,7040 | 16,93 | 0,0092* |
| X ₃ ² | 0,0050 | 1 | 0,0050 | 0,1194 | 0,7438 |
| <i>Residual</i> | 0,2079 | 5 | 0,0416 | | |
| Perda de ajuste | 0,1996 | 3 | 0,0665 | 16,10 | 0,0590 |
| Erro puro | 0,0083 | 2 | 0,0041 | | |
| Total | 2,55 | 14 | | | |
| R ² =0,918 | R ² ajustado =0,7716 | | | | |

%T= porcentagem de transmitância; L* = índice de luminosidade; μ_{dim} = viscosidade dinâmica; M_w = massa molar; μ_{int} = viscosidade intrínseca.; gl= grau de liberdade

*Valores estatisticamente significativos

Os valores de coeficiente de correlação (R²) foram superiores à 0,899, exceto para o L*, onde foi observado valor inferior, mas próximo, ao limite mínimo (R²=0,7) para que o ajuste do modelo aos dados experimentais seja considerado satisfatório (Moore, 2010). O modelo matemático com R² mais próximo de 1 indica melhor correlação entre os valores experimentais e preditos (Sousa et al., 2010).

3.2. Efeito da ozonização na cor do alginato

A cor do alimento é um importante atributo sensorial, já que é um fator determinante na decisão da compra, estando, muitas vezes, relacionada com a qualidade do produto. O alginato de sódio, quando extraído de alga parda, apresenta coloração marrom, e o seu uso sem um prévio tratamento de clareamento, irá alterar a cor do produto final, causando rejeição e insatisfação no mercado consumidor. Assim, a cor do alginato

de sódio após o clareamento foi avaliada através de análise de porcentagem de transmitância (%T) e índice de luminosidade (L^*), já que este atributo é um importante parâmetro de qualidade do produto final.

3.2.1. Efeito dos parâmetros da ozonização na porcentagem de transmitância (%T) da solução de alginato de sódio

A solução de alginato de sódio sem ozonização (amostra controle) apresentou o menor valor de transmitância e, conseqüentemente, a cor mais escura. Os valores de porcentagem de transmitância dos diferentes tratamentos variaram entre 37,5 a 83,6 % (Tabela 1) sendo que o tratamento 1 foi o que obteve a solução mais clara seguido, em ordem decrescente, dos tratamentos 14, 15 e 13. Os resultados foram satisfatórios quando comparado com solução de alginato de sódio 1% (m/v) comercial (Grindsted® Alginate FD 175, Danisco) que apresentou 90,4% de transmitância.

O modelo quadrático predito para a transmitância, na forma codificada, com somente os termos significativos do modelo (X_1 , X_1^2 , X_3^2), é apresentado na Eq 12.

$$\% T = 74,38 + 13,96 * X_1 - 0,22 * X_3 - 12,37 * X_1^2 - 14,49 * X_3^2 \quad (12)$$

A superfície de resposta tridimensional do modelo quadrático que descreve a resposta da transmitância (Eq 12) é apresentada na Figura 4, onde pode ser observado que o fluxo de O_2 (X_2) não apresenta influência significativa sobre a %T, enquanto que a temperatura (X_3), nas condições mais alta e baixa, apresentam influência negativa na resposta. Por outro lado, o tempo (X_1) foi o que exerceu maior influência na %T, apresentando uma relação diretamente proporcional. Esses resultados indicam que, para obtenção de uma solução com maior %T, portanto, mais clara, a reação de ozonização deve ser realizada no maior tempo de exposição, à 25°C e independente do fluxo de oxigênio utilizado, podendo assim ser utilizado o menor fluxo para economia de gás oxigênio.

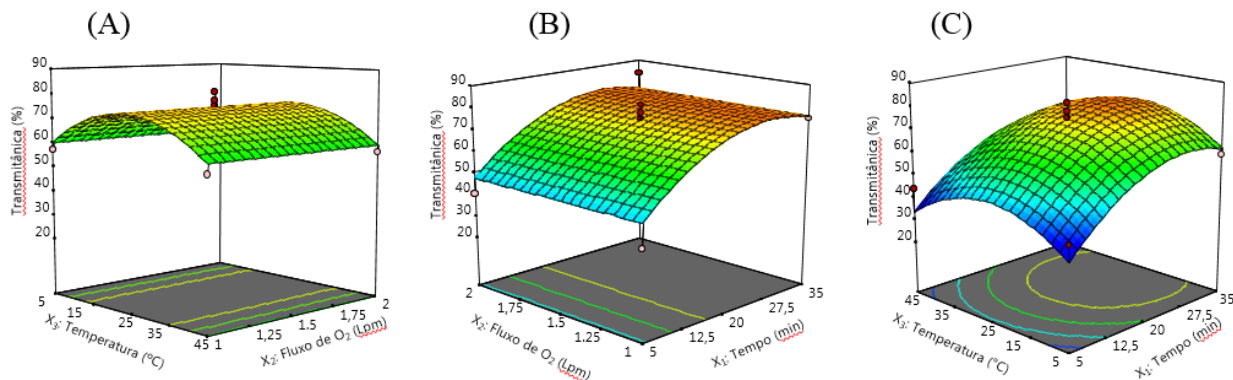


Figura 4. Gráfico de superfície de resposta do tempo, fluxo de oxigênio e temperatura do clareamento de solução alginato de sódio sobre a porcentagem de transmitância. As variáveis fixas de cada gráfico foram definidas para o valor codificado 0 (A) 20 min, (B) 25 °C e (C) 1,5 L/min.

3.2.2. Efeito dos parâmetros da ozonização no índice de luminosidade (L^*) do alginato de sódio

O índice de luminosidade L^* da amostra controle (sem tratamento) foi a que obteve menor valor, enquanto que os maiores valores deste parâmetro foram verificados nos tratamentos 14 e 1 (Tabela 1). Apesar do modelo linear ajustar melhor os dados experimentais do que o quadrático, este não foi capaz de prever satisfatoriamente o índice de luminosidade L^* , já que a falta de ajuste foi significativa em relação ao erro puro (Tabela 2), o que não é desejável. A Eq 13 apresenta a equação codificada, apenas para o termo significativo do modelo (X_1) para o índice de luminosidade L^* .

$$L^* = 63,31 + 8,16 * X_1 \quad (13)$$

Apesar da falta de ajuste do modelo aos dados experimentais de luminosidade, pode ser verificado que dentre os parâmetros estudados, o tempo (X_1) exibiu um impacto positivo no índice de luminosidade, apresentando uma relação diretamente proporcional à resposta, ou seja, à medida que se aumenta o tempo, maior foi o valor de L^* (Figura 5). Os resultados obtidos de cor foram satisfatórios, uma vez que, os tratamentos 14 e 1 apresentaram maior transmitância e maior índice L^* , sendo estes os que apresentaram pós de alginato mais claros.

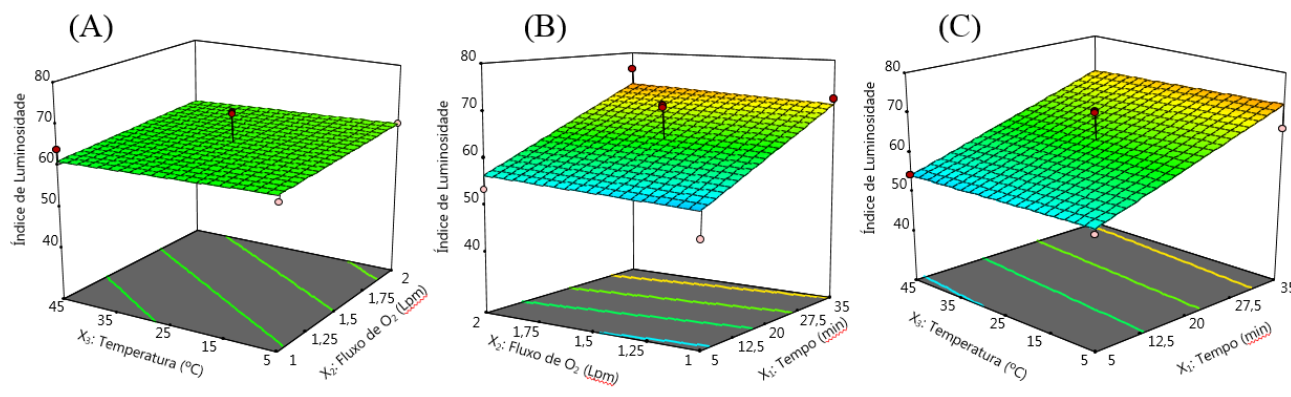


Figura 5. Gráfico de superfície de resposta do tempo, fluxo de oxigênio e temperatura do clareamento de solução alginato de sódio sobre o índice de luminosidade. As variáveis fixas de cada gráfico foram definidas para o valor codificado 0 (A) 20 min, (B) 25 °C e (C) 1,5 L/min.

3.3. Efeito dos parâmetros da ozonização na proporção M/G do alginato de sódio

A determinação da composição estrutural e sequencial do alginato de sódio, por espectroscopia de RMN ^1H , estabelece sua funcionalidade e possíveis aplicações em diferentes setores industriais. Os espectros das amostras foram utilizados na determinação das frações individuais (M e G) e duplas (MM, GG e MG=GM*) dos ácidos manurônicos (M) e gularônicos (G), assim como a razão M/G. Para isso, foram utilizadas as áreas dos sinais nas regiões anoméricas que, para frações de alginato de sódio, podem ser observadas entre os sinais de 4,25 a 5,5 ppm (Grasdalen et al. (1979, 1983)), confirmando a estrutura do alginato de sódio extraído de algas marinhas.. Os limites e ajustes da integração aplicados aos cálculos (Tabela 4, ASTM Standard F2259-10, 2010) das áreas denotadas A, B e C na região anomérica (Figura 6) na Tabela 3.

*Para cadeias longas (grau de polimerização > 20), correções para os resíduos das extremidades reductoras) são negligenciados, portanto, $F_{GM}=F_{MG}$

Tabela 3Ajuste da região de interesse do espectro de RMN H^1 do alginato de sódio.

| Sinal | Deslocamento químico δ (ppm) | Atribuição |
|-------|--|-------------------------|
| A | 5,08 | G (próton 1) |
| B1 | 4,76 | <u>G</u> M (próton 5) |
| B2 | 4,73 | M <u>G</u> M (próton 5) |
| B3 | 4,7 | <u>M</u> G (próton 1) |
| B4 | 4,67 | <u>M</u> M (próton 1) |
| C | 4,47 | <u>G</u> G (próton 5) |

Tabela 4Relações empregadas para análise quantitativa por RMN H^1 dos alginatos.

| | |
|-------------------|--|
| Fração individual | $G = 0,5 \times (I_A + I_C + 0,5 \times (I_{B1} + I_{B2} + I_{B3}))$ $M = I_{B4} + 0,5 \times (I_{B1} + I_{B2} + I_{B3})$ $\text{Razão M/G} = M/G$ |
| Fração dupla | $GG = 0,5 \times (I_A + I_C - 0,5 \times (I_{B1} + I_{B2} + I_{B3}))$ $MG = GM = 0,5 \times (I_{B1} + I_{B2} + I_{B3})$ $MM = I_{B4}$ |

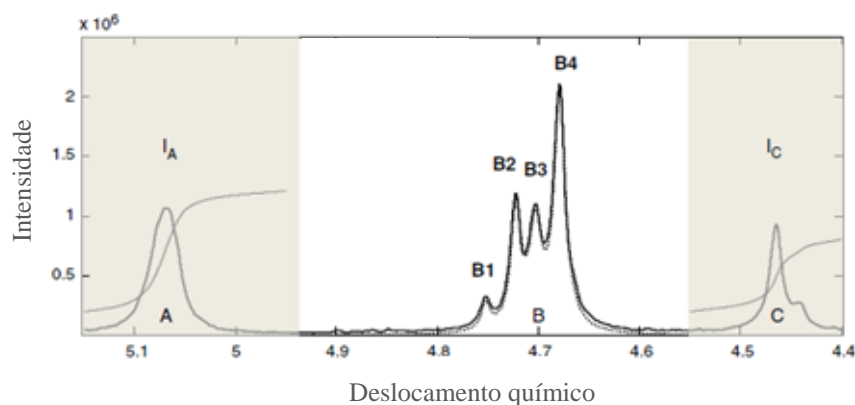
**Figura 6.** Espectro de RMN H^1 de alginato de sódio em que os picos A e C são integrados enquanto que as integrais dos picos B1, B2, B3 e B4 são obtidos por deconvolução (Jensen, Larsen e Engelsen (2015)).

Tabela 5
Parâmetros de composição e estrutura dos alginatos.

| Tratamentos | F _G | F _M | F _{GG} | F _{MM} | F _{GM} | M/G |
|-------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| 1 | 0,59 | 0,41 | 0,47 | 0,29 | 0,12 | 0,69 |
| 2 | 0,60 | 0,40 | 0,49 | 0,29 | 0,11 | 0,67 |
| 3 | 0,60 | 0,40 | 0,48 | 0,28 | 0,12 | 0,66 |
| 4 | 0,61 | 0,39 | 0,50 | 0,28 | 0,11 | 0,64 |
| 5 | 0,61 | 0,39 | 0,50 | 0,28 | 0,11 | 0,64 |
| 6 | 0,59 | 0,41 | 0,47 | 0,29 | 0,12 | 0,68 |
| 7 | 0,60 | 0,40 | 0,49 | 0,28 | 0,12 | 0,66 |
| 8 | 0,60 | 0,40 | 0,48 | 0,29 | 0,11 | 0,67 |
| 9 | 0,58 | 0,42 | 0,44 | 0,29 | 0,14 | 0,74 |
| 10 | 0,59 | 0,41 | 0,48 | 0,29 | 0,12 | 0,68 |
| 11 | 0,59 | 0,41 | 0,44 | 0,27 | 0,15 | 0,71 |
| 12 | 0,57 | 0,43 | 0,43 | 0,29 | 0,14 | 0,75 |
| 13 | 0,59 | 0,41 | 0,47 | 0,29 | 0,12 | 0,71 |
| 14 | 0,58 | 0,42 | 0,45 | 0,30 | 0,12 | 0,73 |
| 15 | 0,59 | 0,41 | 0,46 | 0,29 | 0,13 | 0,71 |
| Controle | 0,57 | 0,43 | 0,41 | 0,26 | 0,16 | 0,74 |

Os espectros dos diferentes tratamentos e da amostra controle (sem ozonização) de alginato de sódio (Figura 7) apresentaram sinais característicos do biopolímero e foram similares a outros estudos utilizando o mesmo biomaterial (Andriamanantoanina & Rinaudo, 2010; Arvizu et al., 2007; Borazjani et al., 2017; Grasdalen et al., 1979; Penman & Sanderson, 1972). A quantidade dos blocos manurônicos e gulurônicos homopoliméricos (F_{GG}, F_{MM}) encontrados nas amostras (Tabela 5) foi maior que os heteropoliméricos (F_{MG}, F_{GM}), sendo o conteúdo da fração G encontrada em maior quantidade na estrutura, o que confere maior rigidez ao gel formado pelo alginato de sódio (Rahelivao et al., 2013).

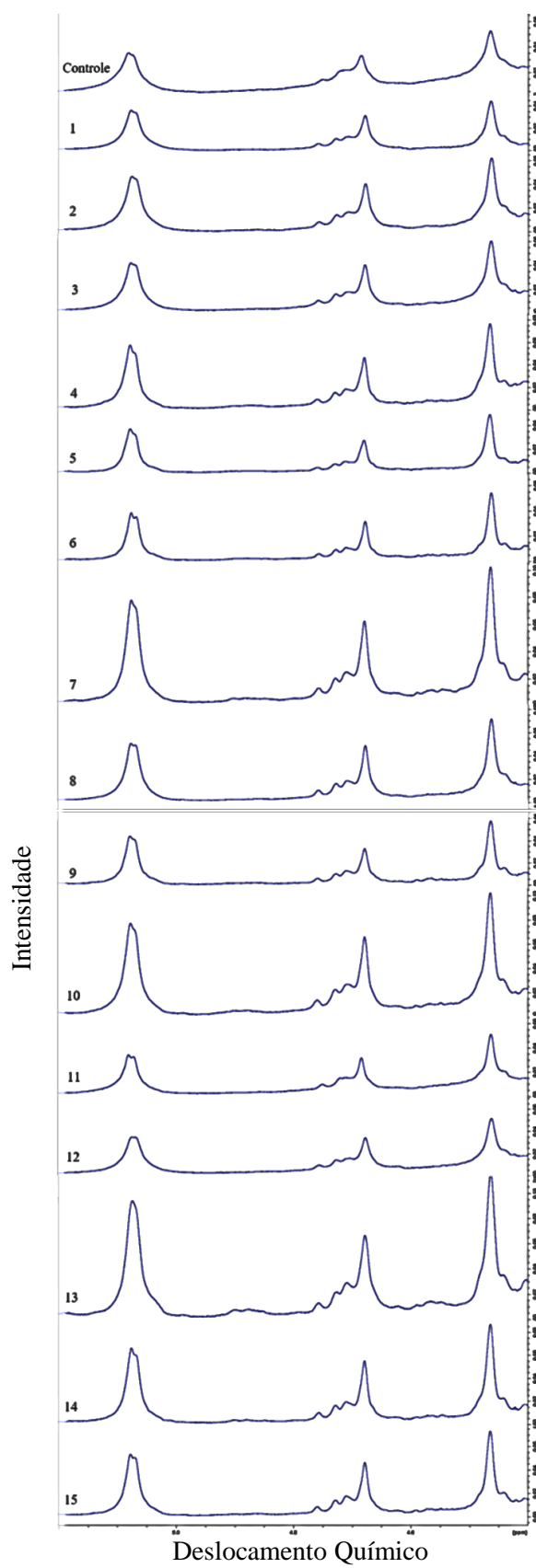


Figura 7. Espectros de RMN H^1 do alginato de sódio controle (sem tratamento) e submetidos a diferentes tratamentos de ozonização.

Outro importante indicador, amplamente utilizado para caracterização do biopolímero, em relação à formação de géis é a razão M/G (Penman & Sanderson, 1972). Segundo Day (1998), a maioria dos alginatos extraídos de algas tem a proporção M/G entre 0,45 e 1,85. Os valores das razões M/G, dos diferentes tratamentos encontrados nesse estudo, variam entre 0,64 e 0,75 (Tabela 2) e se enquadram dentro do intervalo (0,52 – 1,27) verificados com algas do gênero *Sargassum* (Bertagnolli et al., 2014; Davis, Volesky & Mucci, 2003; Davis et al., 2004; El Atouani et al., 2016; Fenoradosa et al., 2010; Larsen et al., 2003; Torres et al., 2007), sendo classificados com uma razão M/G baixa. As proporções M/G podem apresentar uma grande amplitude em seus valores pois as composições estruturais são influenciadas pelas diferentes espécies, época e localização de coleta das algas, assim como procedimento de extração do alginato de sódio (Bertagnolli et al., 2014, Craigie et al., 1984; Indergaard & Skjak-braek, 1987; Mairh, 1982; Nishide et al., 1987). Essa diferença na proporção M/G pode ser observada nos alginatos comerciais: N°71238 Fluka (Suíça), que apresentou M/G de 0,43 (Gomez et al, 2009), e o alginato comercial da Sigma-Aldrich (W201502, Lot# MKBT7870V), que apresentou valor de 1,4 (Rhein-Knudsen et al., 2017).

Os alginatos de sódio ozonizados apresentaram em sua composição, prevalência dos conteúdos G, o que origina géis fortes e quebradiços, sendo estes adequados para encapsulação em aplicações biomédicas ou ambientais; alginatos com grande quantidade de conteúdo M formam géis elásticos, o que pode ser desejável em produtos alimentícios, cosméticos ou farmacêuticos (Murillo-Álvarez & Hernández-Carmona, 2007; Penman & Sanderson, 1972).

O modelo quadrático, na forma codificada e com apenas os termos significativos (X_1 , X_2^2 , X_3^2), representando a relação M/G é apresentado na Eq 14.

$$\frac{M}{G} = 0,72 - 0,03 * X_1 + 0,01 * X_2 - 0,02 * X_3 - 0,02 * X_2^2 - 0,03 * X_3^2 \quad (14)$$

Através da superfície de resposta (Figura 8), que representa a Eq 14, pode ser observado que o fluxo de oxigênio (X_2) e a temperatura (X_3) tem influência similar em relação à proporção M/G, obtendo melhor resultado no tratamento com as variáveis do ponto central. Entretanto, o tempo (X_1) apresenta uma relação inversamente proporcional à variável dependente, ou seja, quanto maior à exposição ao gás ozônio, menor será a proporção M/G.

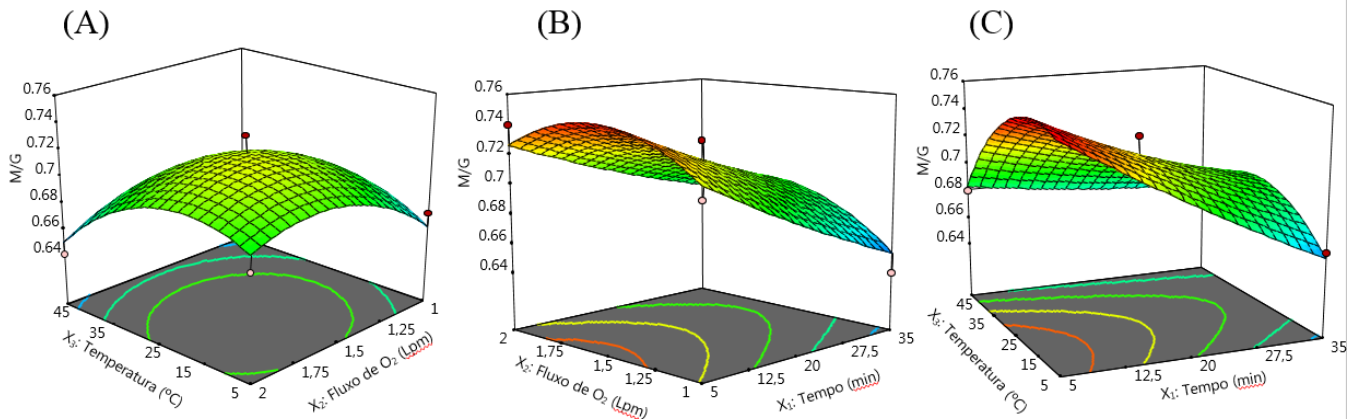


Figura 8. Gráfico de superfície de resposta do tempo, fluxo de oxigênio e temperatura do clareamento de solução alginato de sódio sobre a razão M/G. As variáveis fixas de cada gráfico foram definidas para o valor codificado 0 (A) 20 min, (B) 25 °C e (C) 1,5 L/min.

3.4. Efeito dos parâmetros da ozonização na viscosidade dinâmica (μ_{din}) do alginato de sódio

As curvas de fluxo, definidas pela relação entre viscosidade aparente (μ_{ap}) e taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) (Figura 9), assim como tensão de cisalhamento (τ) e taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) (Figura 10) permitem verificar o comportamento de fluxo das soluções de alginato de sódio submetidas aos diferentes tratamentos de clareamento. A partir destes reogramas é possível estabelecer se um líquido, em determinadas condições de tensão de cisalhamento e taxa de deformação, apresenta um comportamento de fluxo Newtoniano ou não-Newtoniano (Bongiovani et al., 2008). As soluções de alginato de sódio, após ozonização e controle apresentaram comportamento Newtoniano com coeficiente de ajuste (R^2) acima de 0,99.

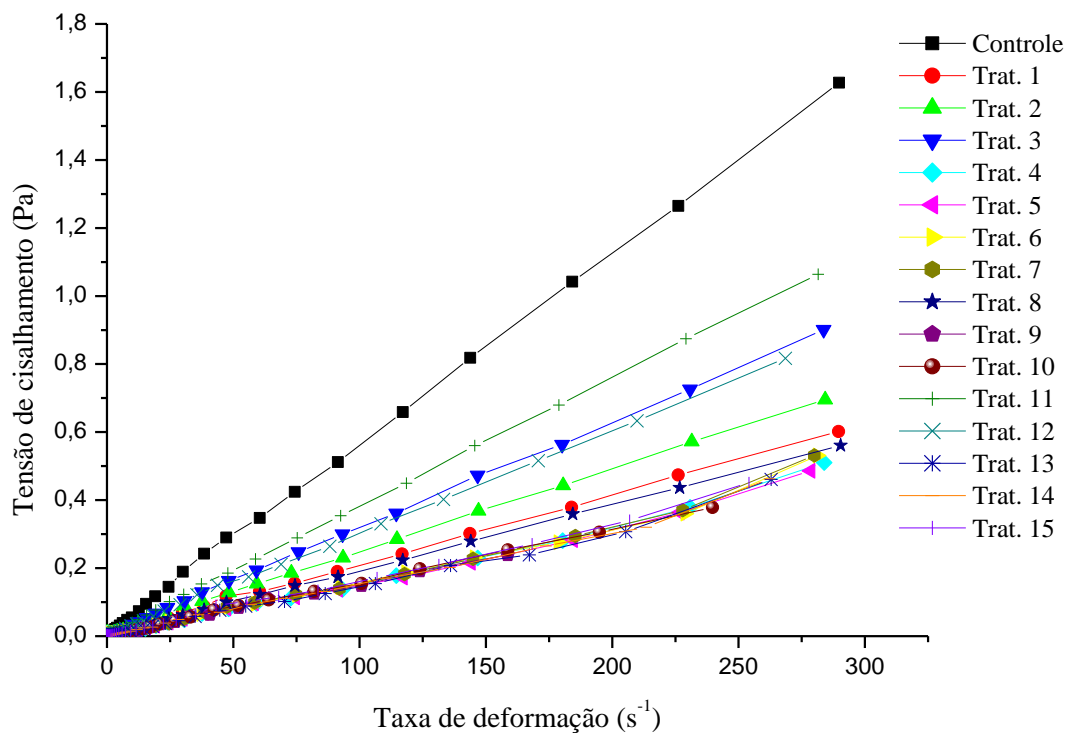


Figura 9. Reograma da tensão de cisalhamento (τ) em função da taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) das soluções de alginato de sódio 1% submetidas a diferentes tratamentos.

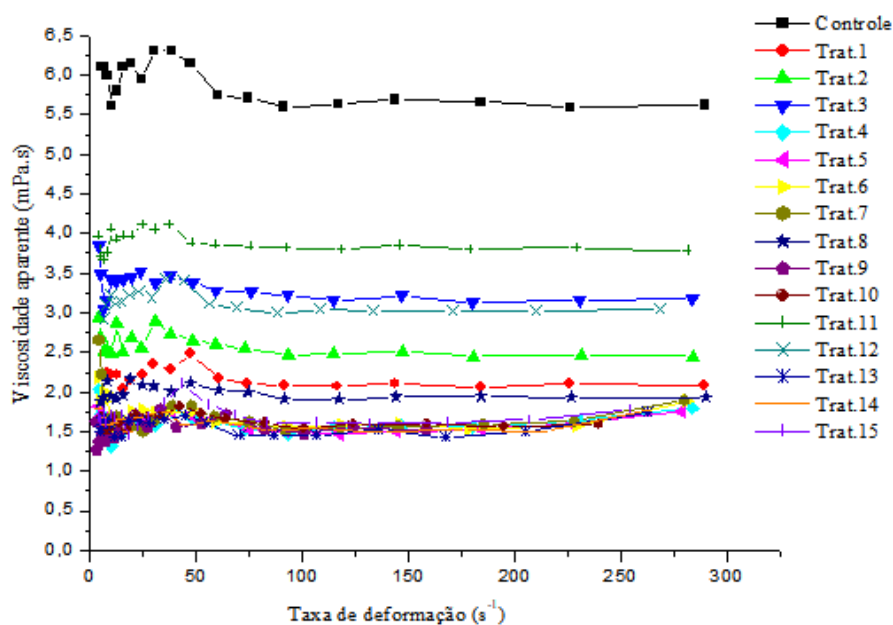


Figura 10. Reograma da viscosidade aparente (μ_{ap}) em função da taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) das soluções de alginato de sódio 1% submetidas a diferentes tratamentos.

A viscosidade, propriedade física de um líquido em resistir ao fluxo induzido pelo cisalhamento, depende de alguns parâmetros tais como temperatura, natureza física da

substância, pressão e taxa de deformação. Os diferentes tipos de curvas de fluxo têm suas correspondentes curvas de viscosidade, que no caso dos líquidos Newtonianos são representados por uma reta paralela à abscissa, mostrando que independente da taxa de cisalhamento, a viscosidade não se altera (Schramm, 2006).

Na Figura 10 pode ser observado um comportamento quase newtoniano dos diferentes tratamentos de ozonização, já que a viscosidade das amostras não apresentou grandes variações com o aumento das taxas de deformação. Um comportamento reológico similar, sem variação da viscosidade em altas taxas de deformação, foi verificado em alginato de sódio extraído de algas do mesmo gênero (Torres et al., 2007) e em alginato de sódio extraído de algas do gênero *Sargassum*, submetido ao clareamento com hipoclorito de sódio (Andriamanantoanina & Rinaudo, 2010).

Entretanto, a maioria dos estudos reológicos com alginato verificaram comportamento não-newtoniano tipo pseudoplástico (El Atouani et al., 2016; Fenoradosoa et al., 2010; Mancini et al., 1996; Lima, 2006). Comparado com esses estudos, o alginato de sódio após ozonização apresentou massa molar baixa (Tabela 1), indicando que, há uma organização menos entrelaçada das cadeias poliméricas e com menos interações intermoleculares, o que reduz a viscosidade das soluções de alginato (Kokini & Surmay, 1994; Yanaki & Yamaguchi, 1990). Essas diferenças no comportamento reológico podem ser devido às variáveis químicas e físicas do alginato de sódio, as quais afetam as propriedades em solução, como temperatura de extração, massa molar do polímero, taxa de deformação utilizadas, concentração e pH da solução do biopolímero (Schweiger, 1962).

O modelo quadrático, representativo da viscosidade dinâmica, contendo apenas os termos significativos (X_1 e X_1^2) é apresentado na Eq 15.

$$\mu_{din} = 0,0017 - 0,0007 * X_1 + 0,0006 * X_1^2 \quad (\text{Equação 15})$$

Analisando a Eq 15 e a superfície de resposta gerada (Figura 11), verifica-se que o tempo exerceu influência negativa na viscosidade dinâmica.

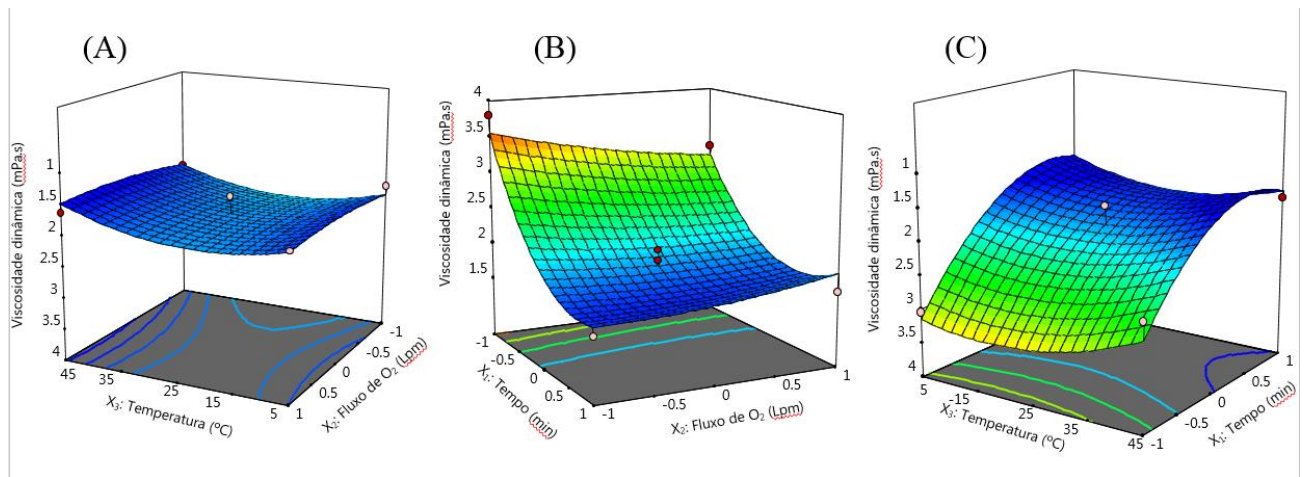


Figura 11. Gráfico de superfície de resposta do tempo, fluxo de oxigênio e temperatura do clareamento de solução alginato de sódio sobre a viscosidade dinâmica. As variáveis fixas de cada gráfico foram definidas para o valor codificado 0 (A) 20 min, (B) 25 °C e (C) 1,5 L/min.

3.5. Efeito dos parâmetros da ozonização na massa molar (M_v) e viscosidade intrínseca [μ] do alginato

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica determina a viscosidade produzida por uma única molécula dispersa no solvente, sem interação com outras moléculas de polímero, estando relacionada com o volume hidrodinâmico do soluto na solução. Além disso, medidas da viscosidade de soluções poliméricas diluídas permitem o cálculo de uma massa molar média e, quanto maior o seu valor, mais viscosa é a solução (Canevarolo, 2002).

Visto que as respostas de viscosidade intrínseca e massa molar se correlacionam, os resultados estatísticos das representações das superfícies de resposta foram similares (Tabela 2). As equações preditivas codificadas para massa molar (M_v) (Eq 16) e viscosidade intrínseca [μ] (Eq 17) estão apresentadas a seguir:

$$M_v = 22,45 + 5,87 * X_1 + 6,05 * X_2 - 13,27 * X_3 + 19,60 * X_1^2 + 20,22 * X_2^2 \quad (16)$$

$$[\eta] = 0,4892 + 0,1250 * X_1 + 0,13B - 0,2825 * X_3 + 0,4188 * X_1^2 + 0,4338 * X_2^2 \quad (17)$$

A partir dos gráficos de superfície de resposta para massa molar (Figura 12) e viscosidade intrínseca (Figura 13), assim como suas respectivas equações (Eqs 16 e 17), pode ser verificado que quando utilizados os valores máximos e mínimos do tempo (X_1)

e do fluxo de oxigênio (X_2), há o aumento da viscosidade intrínseca e massa molar do alginato de sódio. Em contrapartida, a temperatura (X_3) apresenta uma relação inversamente proporcional às respostas, ou seja, o aumento da temperatura acarreta a redução das respostas.

A viscosidade intrínseca das soluções de alginato de sódio, submetida a diferentes tratamentos de ozonização, apresentou variação entre 0,42 a 1,58 dL/g (Tabela 1), enquanto a massa molar variou de 19,41 a 73,59 kDa (Tabela 1). Um estudo reporta resultado semelhante para a massa molar do alginato comercial (50 kDa; Sigma-Aldrich) (Perez et al., 2014), apesar de ter sido verificado, neste estudo, valor inferior (7,83 dL/g e 374,28 kDa) para alginato de sódio Grindsted® Alginate FD 175 (Danisco). Comparando com outros trabalhos, os resultados aqui obtidos foram inferiores aos reportados por Torres et al. (2007), estudando alginato de sódio extraído de alga do gênero *Sargassum*, que verificaram viscosidade intrínseca de 4,1 e 6,9 (dL/g) e massa molar de 194 e 330 kDa, para amostras extraídas em 1h e 5h, respectivamente.

As soluções de alginato de sódio ozonizadas sofreram uma redução de 47 a 86% dos valores de viscosidade intrínseca e massa molar quando comparadas à amostra controle (Tabela 1). Alginatos de sódio extraídos de duas espécies de alga *Sargassum*, e submetidos ao clareamento com hipoclorito de sódio, apresentaram 1,92 e 2,06 dL/g de viscosidade intrínseca com uma redução de 90 e 50%, respectivamente, em relação a suas amostras-controle (Andriamanantoanina & Rinaudo, 2010). Desta forma, pode-se inferir que a aplicação de ozônio nas soluções de alginato resulta na redução da viscosidade intrínseca e, conseqüentemente, da massa molar em proporções similares ao tratamento com hipoclorito de sódio.

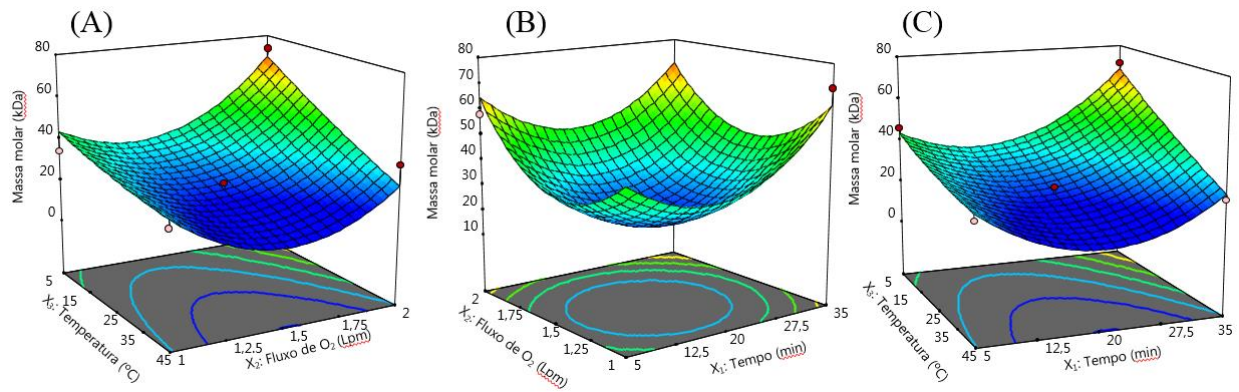


Figura 12. Gráfico de superfície de resposta do tempo, fluxo de oxigênio e temperatura do clareamento de solução alginato de sódio sobre a massa molar. As variáveis fixas de cada gráfico foram definidas para o valor codificado 0 (A) 20 min, (B) 25 °C e (C) 1,5 L/min.

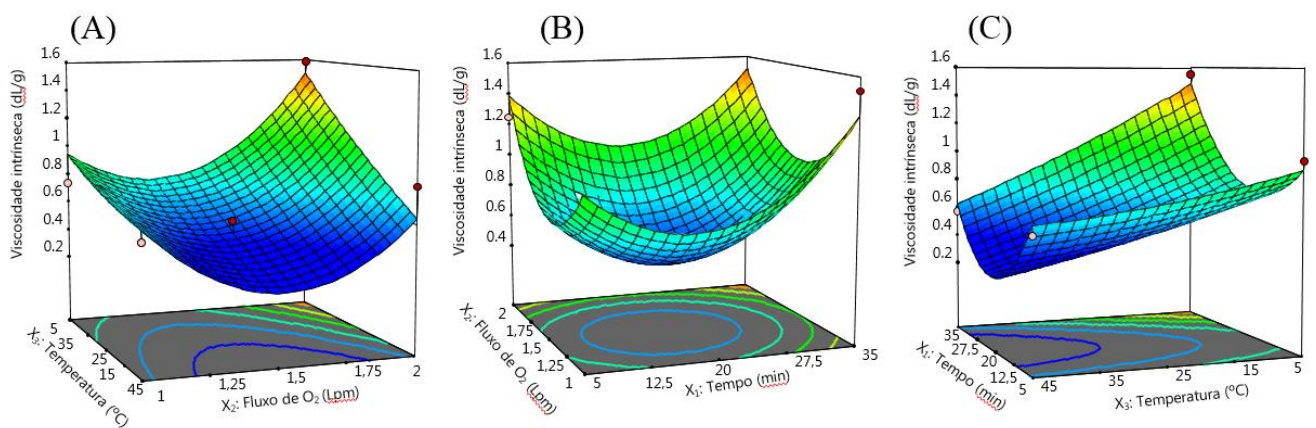


Figura 13. Gráfico de superfície de resposta do tempo, fluxo de oxigênio e temperatura do clareamento de solução alginato de sódio sobre a viscosidade intrínseca. As variáveis fixas de cada gráfico foram definidas para o valor codificado 0 (A) 20 min, (B) 25 °C e (C) 1,5 L/min.

3.6. Otimização e validação do processo de clareamento de alginato de sódio extraído de alga parda

A otimização multiresposta para os parâmetros de clareamento (fluxo de oxigênio 2 L/min por 35 min à 25° C) do alginato para obtenção dos máximos valores de resposta (porcentagem de transmitância (%T= 83,6), índice de luminosidade (L^* = 76,29), proporção M/G (0,75), viscosidade dinâmica ($\mu_{\text{din}} = 3,80$ mPa.s), massa molar ($M_v = 73,59$ kDa) e viscosidade intrínseca ($[\eta] = 1,59$ dL/g)) foi realizada através da função desejabilidade. O valor de desejabilidade máxima da otimização encontrado foi 0,912, que está dentro da faixa aceitável ($0 \leq d \leq 1$), sendo que quanto maior a desejabilidade, mais preciso será a adequação das variáveis independentes na otimização (Derringer & Suich, 1980).

O processo de clareamento por ozonização realizado nas condições otimizadas apresentou %T= 87,8, $L^* = 58,35$, M/G = 0,70, $\mu_{\text{din}} = 1,39$ mPa.s, $M_v = 66,30$ kDa e $[\eta] = 1,43$ dL/g. Esses valores são similares aos encontrados no Tratamento 1, já que a condição otimizada foi a mesma utilizada nesse tratamento, exceto o valor do índice de luminosidade que foi inferior, podendo ser explicado pelo modelo preditivo deste parâmetro que não foi significativo. Isto indica que o modelo pode ser considerado satisfatório para prever o efeito de cada parâmetro de ozonização (tempo, temperatura e fluxo de oxigênio) na qualidade do alginato de sódio (porcentagem de transmitância, proporção M/G, viscosidade dinâmica, massa molar e viscosidade intrínseca).

Os índices colorimétricos atingiram resultados satisfatórios quando comparados com o alginato comercial e sua composição estrutural e propriedades reológicas apontam para aplicabilidade em processos de encapsulação.

3.7. Avaliação da capacidade antioxidante do alginato de sódio clareado sob as condições otimizadas

A quantificação de cada componente antioxidante separadamente é relativamente difícil devido à existência de diversos componentes antioxidantes. Assim, diferentes métodos analíticos têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante total de amostras (Prabhakar et al., 2006; Wangensteen, Samuelsen & Malterud, 2004). Esses métodos visam atingir o sistema de defesa oxidante por meio de diferentes mecanismos os quais são remoção de espécies reativas de oxigênio e radicais hidroxila, redução de radicais peroxila lipídica, inibição da peroxidação lipídica ou quelação de íons metálicos.

3.7.1 Capacidade antioxidante do alginato de sódio ozonizado por ABTS (Atividade antioxidante equivalente ao trolox)

A capacidade antioxidante do alginato extraído de algas *Sargassum* foi avaliada pela análise baseada na transferência de elétrons, sendo o cátion ABTS⁺ utilizado como oxidante. As análises foram realizadas na amostra controle, ozonizada e comercial (Grindsted® Alginate FD 175, Danisco), apresentando $49,86 \pm 0,45$, $24,62 \pm 0,01$ e $12,36 \pm 0,09$ uM TE/g, respectivamente. Os resultados demonstraram que o alginato de sódio extraído das algas pardas, sem nenhum processo de clareamento, apresentou maior efeito na eliminação do radical livre, seguido das amostras ozonizada e comercial. Pode ser verificado que o alginato clareado pelo processo de ozonização apresentou o dobro de atividade antioxidante, quando comparado com o comercial, o qual foi tratado com hipoclorito de sódio, mostrando que o uso do gás ozônio tem grande potencial, além do clareamento, na preservação de compostos bioativos.

3.7.2 Capacidade antioxidante do alginato de sódio ozonizado por DPPH

O DPPH tem sido utilizado extensivamente como um radical livre para investigar compostos antioxidantes de algas e seus polissacarídeos (Borazjani et al., 2017; Fleita, El-Sayed & Rifaat, 2015; Molyneux, 2004; Khaled, Hiba & Asma, 2012; Sellimi et al., 2015).

Os resultados apontam que a atividade antioxidante é dependente da concentração da solução de alginato, como apresentado na Figura 14, em que há um aumento linear da atividade antioxidante com a concentração, até atingir o valor máximo, mantendo-se constante nas concentrações maiores de alginato. As amostras controle e a ozonizada exibiram resultados similares em todas as concentrações, apresentando os valores máximos de 54,48 e 50,84%, respectivamente. Este fato indica que o processo de clareamento por ozonização não causou decréscimo significativo na atividade antioxidante do alginato. O alginato de sódio comercial aqui estudado apresentou o menor valor (42,57%) de atividade antioxidante. Desta forma, os resultados indicam que o processo de clareamento por ozonização pode ser menos prejudicial aos compostos antioxidantes quando comparado ao tratamento com hipoclorito de sódio comercial. Estudos utilizando ozônio como agente desinfetante apontam que este composto não prejudicou a capacidade antioxidante de frutas ou verduras e em alguns casos melhorou suas propriedades nutricionais (Alothman et al., 2010; Beltrán et al., 2005; Rodoni et al., 2009; Yeoh, Ali & Forney, 2014).

Comparando os resultados encontrados neste estudo, estes foram inferiores ao verificado por Sellimi et al. (2015) que encontraram, aproximadamente, 70% de atividade antioxidante em alginato extraído de algas *Cystoseira barbata* na concentração de 1000 ug/mL. Entretanto, valor similar (40%) na concentração de 1000 ug/mL foi encontrado por Borazjani et al. (2017) para os alginatos de sódio da alga do gênero *Sargassum* extraídos com tratamento ácido, como executado neste estudo.

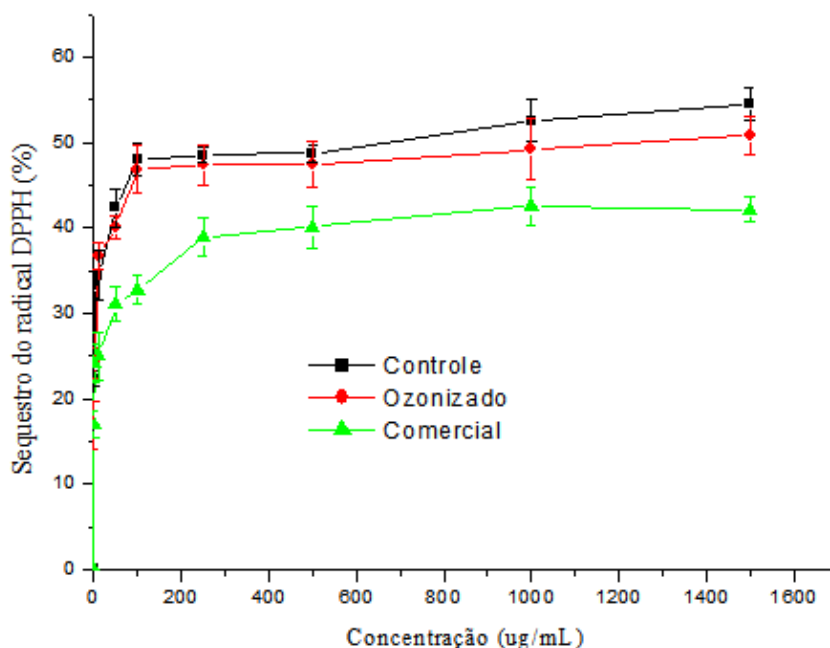


Figura 14. Capacidade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH^{*} das amostras de alginato de sódio controle, ozonizada e comercial.

3.7.3 Capacidade antioxidante por β -caroteno /ácido-linoleico do alginato de sódio ozonizado

Neste sistema, a oxidação do ácido linoleico gera radicais livres que atacam as moléculas de β -caroteno altamente insaturadas. Quando essa reação ocorre, a molécula de β -caroteno libera sua ligação conjugada e a cor alaranjada característica desse composto desaparece (Kulisic et al., 2004). A presença de antioxidantes evita a destruição do β -caroteno e cor laranja é mantida. A Figura 15 mostra um aumento da descoloração de β -caroteno com o aumento da concentração das soluções de alginato. As amostras demonstraram uma baixa habilidade de prevenir o clareamento de β -caroteno. Na concentração de 1,5 mg/mL, as amostras controle e ozonizada apresentaram 26 e 10% de atividade antioxidante, respectivamente. Resultado superior foi verificado por Sellimi et al. (2015) que observaram 60% de atividade antioxidante em alginato de sódio extraído de algas *Cystoseira barbata*. Entretanto, estudos avaliando a capacidade antioxidante por β -caroteno /ácido-linoleico para algas do gênero *Sargassum* não foram encontrados para comparação, já que a atividade antioxidante pode variar entre algas da mesma espécie, como também em gêneros diferentes (Luo et al., 2010).

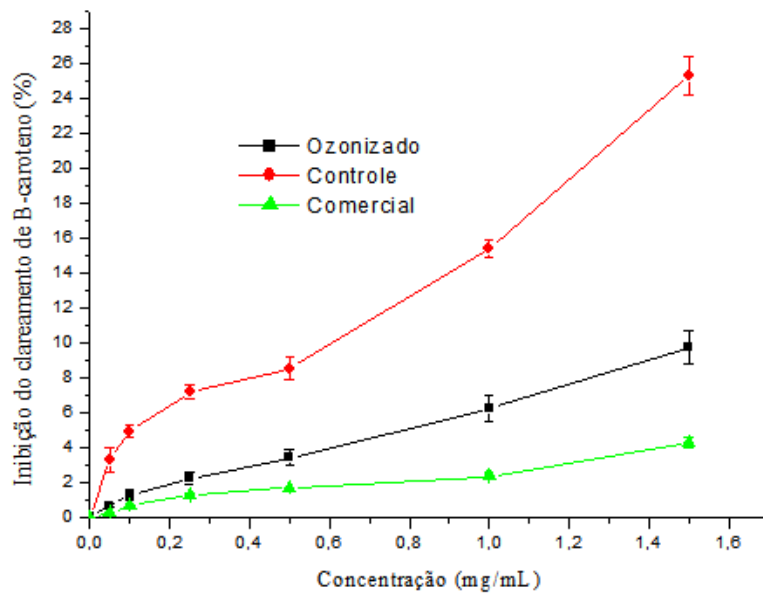


Figura 15. Capacidade antioxidante pelo sistema β -caroteno /ácido-linoleico das amostras de alginato de sódio controle e ozonizada.

4. Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que o ozônio é um agente clarificante promissor para ser utilizado no clareamento de alginato de sódio. Apesar de sua aplicação ter diminuído a massa molar e as viscosidades intrínseca e dinâmica em relação a amostra controle, os resultados de cor (porcentagem de transmitância e índice de luminosidade) mostraram sua eficiência quanto agente clarificante, originando pós claros. Por ser um estudo pioneiro no uso de ozônio no clareamento de solução de alginato de sódio, esses dados podem embasar mais estudos na área, além de serem importantes para o direcionamento da aplicabilidade dos alginatos tratados. A partir da metodologia de superfície de resposta (RSM), pode-se concluir que o tempo foi a variável dependente que exerceu a maior influência nas respostas, seguido da temperatura. A variação do fluxo de oxigênio demonstrou pouca influência nas respostas. Os resultados da RSM, obtidas a partir do delineamento Box-Behnken (BBD) foram adequados para obter as condições otimizadas do processo de clareamento do alginato de sódio extraído da macroalga do gênero *Sargassum*. O alginato de sódio clareado nas condições otimizadas apresentou capacidade antioxidante maior que a amostra comercial, indicando que o processo de clareamento por ozonização foi menos prejudicial aos compostos bioativos. Além disso, os antioxidantes naturais presentes no alginato de sódio aqui estudado podem agregar valor aos produtos que utilizam esse composto em preparações alimentícias.

Referências

- Alothman, M., Kaur, B., Fazilah, A., Bhat, R., & Karim, A. A. (2010). Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innovative food science & emerging technologies*, 11(4), 666-671. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.08.008>
- Andriamanantoanina, H., & Rinaudo, M. (2010). Characterization of the alginates from five madagascan brown algae. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 555-560. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.002>
- Arvizu, D. L., Rodríguez, Y. E., Hernández, G., & Murillo, J. I. (2007). Constituyentes químicos de *Eisenia arborea* Areschoug de Baja California Sur, México. *Investigaciones marinas*, 35(2), 63-69. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-71782007000200007>
- ASTM International. 2010. ASTM F2259-10. Standard test method for determining the chemical composition and sequence in alginate by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy. ASTM International, West Conshohocken, Penn., USA. Available from <http://www.astm.org/Standards/F2259.htm>.
- ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY. "Where did Brazil import alginic acid from in 2016?" 2019. Disponível em: <http://atlas.cid.harvard.edu/explore/?country=32&partner=undefined&product=6680&productClass=HS&startYear=undefined&target=Product&tradeDirection=import&year=2016>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., & Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food chemistry*, 138(2-3), 1764-1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Batista, G., Charles, M. B., Mancini Filho, J., & Vidal, N. (2009). Seaweeds as sources of antioxidant phytomedicines. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2), 1-18.
- Beltrán, D., Selma, M. V., Marín, A., & Gil, M. I. (2005). Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(14), 5654-5663. DOI: 10.1021/jf050359c
- Bertagnolli, C., Espindola, A. P. D., Kleinübing, S. J., Tasic, L., & da Silva, M. G. C. (2014). *Sargassum filipendula* alginate from Brazil: Seasonal influence and characteristics. *Carbohydrate polymers*, 111, 619-623. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.024>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bidin, H., Basri, M., Radzi, S. M., Ariff, A., Rahman, R. N. Z. R. A., & Salleh, A. B. (2009). Optimization of lipase-catalyzed synthesis of palm amino acid surfactant using response surface methodology (RSM). *Industrial crops and products*, 30(2), 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.03.006>
- Bongiovani, R. A. M. (2008). Características reológicas do exopolissacarídeo botiosferana produzido pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em três fontes de carbono: glucose, frutose e sacarose.
- Borazjani, N. J., Tabarsa, M., You, S., & Rezaei, M. (2017). Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*. *International journal of biological macromolecules*, 101, 703-711. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.128>
- Canevarolo Jr, S. V. (2002). Ciência dos polímeros. *Artiber editora, São Paulo*, 110-115.
- Clementi, F., Mancini, M., & Moresi, M. (1998). Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. *Journal of food engineering*, 36(1), 51-62. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00042-9)
- Cong, Q., Xiao, F., Liao, W., Dong, Q., & Ding, K. (2014). Structure and biological activities of an alginate from *Sargassum fusiforme*, and its sulfated derivative. *International journal of biological macromolecules*, 69, 252-259. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.056>
- Craigie, J. S., Wen, Z. C., & Van der Meer, J. P. (1984). Interspecific, Intraspecific and Nutritionally-Determined Variations in the Composition of Agars from *Gracilaria* spp. *Botanica Marina*, 27(2), 55-62. <https://doi.org/10.1515/botm.1984.27.2.55>

- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water research*, 37(18), 4311-4330. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8)
- Davis, T. A., Ramirez, M., Mucci, A., & Larsen, B. (2004). Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from *Sargassum* spp. *Journal of applied phycology*, 16(4), 275-284.
- Day, D. F. (1998). Alginates. In *Biopolymers from renewable resources* (pp. 119-143). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03680-8_5
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12(4), 214-219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from algae. *Biopolymers Online: Biology • Chemistry • Biotechnology • Applications*, 6.
- El Atouani, S., Bentiss, F., Reani, A., Zrid, R., Belattmania, Z., Pereira, L., Mortadi, A., Cherkaoui, O. & Sabour, B. (2016). The invasive brown seaweed *Sargassum muticum* as new resource for alginate in Morocco: Spectroscopic and rheological characterization. *Phycological Research*, 64(3), 185-193. <https://doi.org/10.1111/pre.12135>
- Fenoradosoa, T. A., Ali, G., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., & Michaud, P. (2010). Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. *Journal of applied phycology*, 22(2), 131-137. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9432-y>
- Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C., Silva, E.G.P.; Reis, P.S; Souza, A.S.& Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- Filho, S. S. F., & Sakaguti, M. (2008). Comportamento cinético do cloro livre em meio aquoso e formação de subprodutos da desinfecção. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 13(2), 198-206.
- Fleita, D., El-Sayed, M., & Rifaat, D. (2015). Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1236-1244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.024>
- Fonseca, C. R. (2017). *Ozonização: uma alternativa para clarificação do caldo de cana-de-açúcar* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Gates, K. W. (2012). *Marine Polysaccharides—Food Applications*. Vazhiyil Venugopal: Boca Raton, FL, USA. CRC Press Taylor and Francis Group, 396 p. <https://doi.org/10.1080/10498850.2012.651703>
- Gomez, C. G., Lambrecht, M. V. P., Lozano, J. E., Rinaudo, M., & Villar, M. A. (2009). Influence of the extraction–purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). *International journal of biological macromolecules*, 44(4), 365-371. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.02.005>
- Grasdalen, H., Larsen, B., & Smidsrød, O. (1979). A pmr study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydrate Research*, 68(1), 23-31. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84051-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84051-3)
- Grasdalen, H. (1983). High-field, 1H-nmr spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research*, 118, 255-260. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(83\)88053-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88053-7)
- Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2004). Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Science and Technology*, 37(4), 453-460. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.014>
- Heo, S.-J., Park, E.-J., Lee, K.-W., & Jeon, Y.-J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96(14), 1613–1623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.013>
- Indergaard, M., & Skjåk-Bræk, G. (1987). Characteristics of alginate from *Laminaria digitata* cultivated in a high-phosphate environment. *Hydrobiologia*, 151(1), 541-549.
- Jeong, J. Y., Jo, Y. H., Lee, K. Y., Do, S. G., Hwang, B. Y., & Lee, M. K. (2014). Optimization of pancreatic lipase inhibition by *Cudrania tricuspidata* fruits using response surface

- methodology. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(10), 2329-2333. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.067>
- Khadhraoui, M., Trabelsi, H., Ksibi, M., Bouguerra, S., & Elleuch, B. (2009). Discoloration and detoxification of a Congo red dye solution by means of ozone treatment for a possible water reuse. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2-3), 974-981. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.060>
- Khaled, N., Hiba, M., & Asma, C. (2012). Antioxidant and antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. *Advances in Environmental Biology*, 6(1), 42-48.
- Kirby, A. J., & Schmidt, R. J. (1997). The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs—I. *Journal of ethnopharmacology*, 56(2), 103-108. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)01510-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)01510-9)
- Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(1), 8-17. <https://doi.org/10.1002/pca.611>
- Kokini, J. L., & Surmay, K. (1994). Steady shear viscosity first normal stress difference and recoverable strain in carboxymethyl cellulose, sodium alginate and guar gum. *Carbohydrate polymers*, 23(1), 27-33. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90087-6)
- Kuliscic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4), 633-640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024>
- Larsen, B., Salem, D. M., Sallam, M. A., Mishrikey, M. M., & Beltagy, A. I. (2003). Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea coast. *Carbohydrate research*, 338(22), 2325-2336. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00378-1)
- Lee, J. W., Mo, E. J., Choi, J. E., Jo, Y. H., Jang, H., Jeong, J. Y., Jin, Q., Chung, H. N., Hwang, B. Y. & Lee, M. K. (2016). Effect of Korean Red Ginseng extraction conditions on antioxidant activity, extraction yield, and ginsenoside Rg1 and phenolic content: optimization using response surface methodology. *Journal of ginseng research*, 40(3), 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.08.001>
- Lima, A. M. F. (2006). Estudo de propriedades físico-químicas de alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistema de liberação de fármacos.
- Liu, Y., Wang, J., Zheng, Y., & Wang, A. (2012). Adsorption of methylene blue by kapok fiber treated by sodium chlorite optimized with response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 184, 248-255. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.049>
- Lorbeer, A. J., Lahnstein, J., Bulone, V., Nguyen, T., & Zhang, W. (2015). Multiple-response optimization of the acidic treatment of the brown alga *Ecklonia radiata* for the sequential extraction of fucoxanthin and alginate. *Bioresource technology*, 197, 302-309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.103>
- Luo, H. Y., Wang, B., Yu, C. G., & Su, C. L. (2010). Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(23), 2557-2565. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.609>
- Mairh, O. P. (1982). Seasonal variation in alginic acid and viscosity of sodium alginate from a brown alga, *Cystoseira indica* (Thivy et. Doshi) Mairh, from Port Okha. *Seaweed Research and Utilisation*, 5, 43-46.
- Mancini, M., Moresi, M., & Sappino, F. (1996). Rheological behaviour of aqueous dispersions of algal sodium alginates. *Journal of Food Engineering*, 28(3-4), 283-295. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(95\)00068-2](https://doi.org/10.1016/0260-8774(95)00068-2)
- McHugh, D. J., Hernández-Carmona, G., Arvizu-Higuera, D. L., & Rodríguez-Montesinos, Y. E. (2001). Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. *Journal of applied phycology*, 13(6), 471-479.
- McNeal, T. P., Hollifield, H. C., & Diachenko, G. W. (1995). Survey of trihalomethanes and other volatile chemical contaminants in processed foods by purge-and-trap capillary gas

- chromatography with mass selective detection. *Journal of AOAC International*, 78(2), 391-397.
- Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol* 26:211–219.
- Moore, D. S. (2010). *The basic practice of statistics*. Palgrave Macmillan.
- Murillo-Álvarez, J. I., & Hernández-Carmona, G. (2007). Monomer composition and sequence of sodium alginate extracted at pilot plant scale from three commercially important seaweeds from Mexico. *Journal of applied phycology*, 19(5), 545-548. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9168-5>
- Nishide, E., Anzai, H., & Uchida, N. (1987). A comparative investigation on the water-soluble and the alkali-soluble alginates from various Japanese brown algae [Phaeophyceae]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Nogueira, M. T. (2017). Extração e caracterização de alginato de sódio da macroalga *Sargassum cymosum* C. Agardh.
- O'Donnell, C., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., & Rice, R. G. (Eds.). (2012). *Ozone in food processing*. John Wiley & Sons.
- Ölmez, H., & Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 686-693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>
- Pascual, A., Llorca, I., & Canut, A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends in food science & technology*, 18, S29-S35. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.tifs.2006.10.006>
- Patra, J. K., Rath, S. K., Jena, K., Rathod, V. K., & Thatoi, H. (2008). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum* sp.) extract: A study on inhibition of Glutathione-S-transferase activity. *Turkish Journal of Biology*, 32(2), 119–125.
- Penman, A., & Sanderson, G. R. (1972). A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Research*, 25(2), 273-282. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81637-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81637-7)
- Perez, R. A., Kim, M., Kim, T. H., Kim, J. H., Lee, J. H., Park, J. H., Knowles, J.C. & Kim, H. W. (2013). Utilizing core-shell fibrous collagen-alginate hydrogel cell delivery system for bone tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 20(1-2), 103-114. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0198>
- Prabhakar, K. R., Veeresh, V. P., Vipani, K., Sudheer, M., Priyadarsini, K. I., Satish, R. B. S. S., & Unnikrishnan, M. K. (2006). Bioactivity-guided fractionation of *Coronopus didymus*: A free radical scavenging perspective. *Phytomedicine*, 13(8), 591-595. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.07.003>
- Rahelivao, M. P., Andriamanantoanina, H., Heyraud, A., & Rinaudo, M. (2013). Structure and properties of three alginates from Madagascar seacoast algae. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 143-146. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.005>
- Raymundo, M.S., Horta, P., & Fett, R. (2004). Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(4), 495-503.
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T., Ajalloueiian, F., & Meyer, A. S. (2017). Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp. *Food Hydrocolloids*, 71, 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.016>
- Rocha, F. D., Pereira, R. C., Kaplan, M. A. C., & Teixeira, V. L. (2007). Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Rev Bras Farmacogn*, 17, 631-639. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000400024
- Rodoni, L., Casadei, N., Concellón, A., Chaves Alicia, A. R., & Vicente, A. R. (2009). Effect of short-term ozone treatments on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit quality and cell wall degradation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 594-599. DOI: 10.1021/jf9029145
- Santana, M. H., Da Silva, L. M., Freitas, A. C., Boodts, J. F., Fernandes, K. C., & De Faria, L. A. (2009). Application of electrochemically generated ozone to the discoloration and degradation

- of solutions containing the dye Reactive Orange 122. *Journal of Hazardous materials*, 164(1), 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.108>
- Sartori, J. A. S., Angolini, C. F. F., Eberlin, M. N., & de Aguiar, C. L. (2017). Criegee mechanism as a safe pathway of color reduction in sugarcane juice by ozonation. *Food chemistry*, 225, 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.028>
- Schramm, G. (2006). *Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos*. Artliber Ed.
- Schweiger, R. G. (1962). Acetylation of alginic acid. II. Reaction of algin acetates with calcium and other divalent ions. *The Journal of Organic Chemistry*, 27(5), 1789-1791. 10.1021/jo01052a073
- Sellimi, S., Younes, I., Ayed, H. B., Maalej, H., Montero, V., Rinaudo, M., ... & Nasri, M. (2015). Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *International journal of biological macromolecules*, 72, 1358-1367. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.016>
- Silva, W. S., Sartori, J. A., & Aguiar, C. L. (2015). Combination effect of ozone and heat treatment for the color reduction in sugarcane juice. *Chem Process Eng Res*, 35, 75.
- Sousa, A. M., Alves, V. D., Morais, S., Delerue-Matos, C., & Gonçalves, M. P. (2010). Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology. *Bioresource technology*, 101(9), 3258-3267. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.061>
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2008). Modelling colour degradation of orange juice by ozone treatment using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 88(4), 553-560. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.021>
- Tiwari, B. K., O'donnell, C. P., Muthukumarappan, K., & Cullen, P. J. (2009). Anthocyanin and colour degradation in ozone treated blackberry juice. *Innovative food science & emerging technologies*, 10(1), 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.002>
- Torres, M. R., Sousa, A. P., Silva Filho, E. A., Melo, D. F., Feitosa, J. P., de Paula, R. C., & Lima, M. G. (2007). Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. *Carbohydrate research*, 342(14), 2067-2074. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.05.022>
- Toro, C. A. T. (2016). Estudo da descoloração do corante alimentício amarelo crepúsculo por meio da ozonização (Catalítica).
- Tosik, R., & Wiktorowski, S. (2001). Color removal and improvement of biodegradability of wastewater from dyes production using ozone and hydrogen peroxide. *Ozone Science and Engineering*, 23(4), 295-302. <https://doi.org/10.1080/01919510108962012>
- Turhan, K., Durukan, I., Ozturkcan, S. A., & Turgut, Z. (2012). Decolorization of textile basic dye in aqueous solution by ozone. *Dyes and Pigments*, 92(3), 897-901. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2011.07.012>
- Wangensteen, H., Samuelsen, A. B., & Malterud, K. E. (2004). Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food chemistry*, 88(2), 293-297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.047>
- Yanaki, T., & Yamaguchi, T. (1990). Temporary network formation of hyaluronate under a physiological condition. 1. Molecular-weight dependence. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 30(3-4), 415-425. <https://doi.org/10.1002/bip.360300319>
- Yeoh, W. K., Ali, A., & Forney, C. F. (2014). Effects of ozone on major antioxidants and microbial populations of fresh-cut papaya. *Postharvest Biology and Technology*, 89, 56-58. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.11.006>