

MARCELA TIEMI NOGUEIRA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO DA
MACROALGA *Sargassum cymosum* C. Agardh**

**ASSIS
2017**

MARCELA TIEMI NOGUEIRA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO DA
MACROALGA *Sargassum cymosum* C. Agardh.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de mestra em Biociências (Caracterização e Aplicação da diversidade biológica)

Orientadora: Ivanise Guilherme Branco

ASSIS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CPI)

NOGUEIRA, Marcela Tiemi

N778e Extração e caracterização de alginato de sódio da macroalga
Sargassum cymosum C. Agadh /
Marcela Tiemi Nogueira; orientador: Prof^a Dra. Ivanise Guilherme
Branco. Assis, SP: [s.n], 2017.
58 f.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP.

1. Alginato de sódio 2. Sargassum sp 3. Otimização.
I. Título.

CDU: 682.272

Bibliotecária responsável: Daniele Braga Paião CRB 8ª/6368

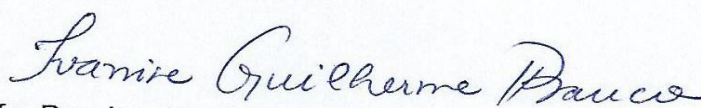
MARCELA TIEMI NOGUEIRA

Extração e caracterização de alginato de sódio proveniente da
macroalga "Sargassum cymosum C. Agardh" visando aplicação
na indústria de alimentos

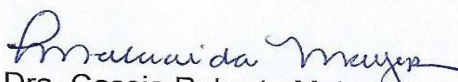
Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras – UNESP/Assis para a
obtenção do título de Mestrado Acadêmico em
BIOCIÊNCIAS (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da Diversidade
Biológica)

Data da Aprovação: 09/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: Profa. Dra. Ivanise Guilherme Branco - UNESP/ASSIS



Membros: Profa. Dra. Cassia Roberta Malacrida Mayer - UNESP/ASSIS



Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes - USP/PIRASSUNUNGA

Dedico essa dissertação a Deus, aos meus pais, Clóvis e Kiyoko, a minha irmã, Priscila, e ao meu namorado Júnior. Que sempre incentivaram meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por ter me dado forças para superar cada dia da minha vida, por sempre me amparar nas dificuldades e por todas graças concedidas.

Aos meus pais, Clóvis e Kiyoko, a eles o meu amor eterno e minha gratidão pelo suporte que sempre me deram. Sendo alicerces, sempre me apoiando, aconselhando e guiando meus passos.

Ao meu namorado, Júnior, por sempre estar presente, mesmo estando longe. Pelos sacrifícios feitos, pelas noites de consolo e pela paciência nas horas mais difíceis, agindo sempre com carinho e compreensão.

Agradeço a minha irmã Priscila, pelo amor e paciência comigo em tantos momentos, pelos conselhos dados e pelas orações que sempre me ajudaram.

A Lorena, por trazer alegria nos momentos mais difíceis. Ao Ricardo, pela amizade e conselhos e orações dadas nos momentos em que mais precisava.

Aos meus amigos e familiares, que sempre compreenderam a minha ausência e me ampararam em todos os momentos, dando palavras de apoio: Elisa, Lizie, Larissa, Letícia, Amanda, Diego, Nathália, Jonas, Tia Silvia, Tata, Luiz, Wânia, Wellington, Tia Keiko, Tia Tieco, Tio Hideo, Tio Valmir, Marisa, Darci, Gislene, Luciana. Aos meus avôs, Hideko (in memoriam), Gumercindo (in memoriam) e Dulce, por me presentear com o bem mais precioso, meus pais, e por me apoiarem durante a minha vida e por deixarem bons exemplos e doces lembranças. À Nina e Maya, por sempre estarem ao meu lado me acompanhando nas horas de estudos.

Agradeço a minha orientadora Ivanise, pela oportunidade e pela paciência ao me conduzir nessa conquista, sempre com uma palavra amiga e protetora. Aos professores que me auxiliaram nesse projeto: Isabel, Ciro, Catarina, Eutímio Gustavo, Cássia, muito obrigada pela disposição e pelos ensinamentos valiosos. Aos funcionários da UNESP por sempre me socorrerem com um sorriso no rosto, meus sinceros agradecimentos: Giba, Allan e Amábile.

Aos amigos de laboratório: Rodolfo, Adriana, Karin, Gabriela, Camila, Letícia e Edson, meus agradecimentos por toda ajuda e pela amizade.

Minha gratidão a todos que passaram e fizeram parte de minha história, deixando palavras de carinho e força, contribuindo nessa conquista! Muito obrigada.

“Todavia, esse tesouro nós o levamos em vasos de barro, para que todos reconheçam que esse incomparável poder pertence a Deus e não é propriedade nossa. Somos atribulados por todos os lados, mas não desanimados; somos expostos em extrema dificuldade, mas não somos vencidos por nenhum obstáculo; somos perseguidos, mas não abandonados; prostrados por terra, mas não aniquilados. É por isso que nós não perdemos a coragem. Pelo contrário: embora o nosso físico vá se desfazendo, o nosso interior vai se renovando a cada dia. Pois a nossa tribulação é momentânea e leve, em relação ao peso extraordinário da glória eterna.

(2 Coríntios 4, 7-9 16-17)

NOGUEIRA, Marcela Tiemi. **Extração e caracterização de Alginato de sódio da macroalga *Sargassum cymosum* C. Agardh.** 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

RESUMO

As algas marinhas pardas são as principais fontes de alginato de sódio utilizados na indústria alimentícia. O Brasil não possui o processamento de alginato, sendo assim dependente de produtos importados para suprir a demanda. A macroalga *Sargassum sp.* é comumente encontrada nas regiões costeiras do litoral de São Paulo, a extração de alginato dessa alga possibilitaria autonomia brasileira na produção de alginato de sódio. O meio ambiente e as condições climáticas em que as algas marinhas vivem influencia no rendimento de alginato, na massa molecular e na capacidade antioxidante. No primeiro capítulo foi realizado a otimização da extração de alginato de sódio por delineamento Box-Behnken e também o estudo da influência dos parâmetros de pH, temperatura e tempo de extração sobre o rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular. O pH influencia no rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular, enquanto que o tempo apresentou baixo efeito sobre o rendimento e a temperatura não influenciou nas respostas avaliadas. Os resultados da otimização mostraram que máximo rendimento (46,04%), viscosidade intrínseca (4,89 dL/g) e massa molecular (231,78 kDa) podem ser obtidos utilizando na extração a temperatura de 80°C, pH 10 por 90,08 minutos. No segundo capítulo foram estudados alginatos extraídos de *Sargassum cymosum* C. Agardh coletadas em duas localidades diferentes do litoral de São Paulo (Ubatuba-ASU e São Sebastião-ASS) com relação ao rendimento, massa molecular, comportamento reológico e atividade antioxidante, verificando a diferença entre os alginatos extraídos. O rendimento apresentou maior valor para os alginatos da alga coletada em ASS, porém as maiores massa moleculares foram observadas nas algas de Ubatuba (ASU). A maior atividade antioxidante foi verificada no alginato de ASU, que pode ser devido ao meio ambiente e condições climáticas em que a alga estava exposta durante seu crescimento. O estudo de comportamento reológico para as ASU apresentaram alginatos com características de fluido newtoniano, enquanto para ASS, fluido psedoplástico.

Palavras-chave: Alginato de sódio. *Sargassum cymosum* C. Agardh. Otimização. *Box Behnken*. Capacidade antioxidante. Comportamento reológico.

NOGUEIRA, Marcela Tiemi. **Extraction and characterization of sodium alginate from the *Sargassum cymosum* C. Agardh macroalgae.**2017. 58 p. Dissertation (Master's degree in Biosciences). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

ABSTRACT

Brown seaweeds are the main sources of sodium alginate used in the food industry. Brazil doesn't have alginate processing, so it is dependent on imported products to supply the demand. The macroalgae *Sargassum* sp. is commonly found in the coastal regions of São Paulo, the extraction of alginate from this alga would allow Brazilian autonomy in the production of sodium alginate. The environment and climatic conditions in which marine algae live influence alginate yield, molecular weight and antioxidant capacity. In the first chapter, the optimization of the sodium alginate extraction by the Box-Behnken design was carried out, as well as the influence of pH, temperature and extraction time parameters on yield, intrinsic viscosity and viscosimetric molecular mass. pH influenced yield, intrinsic viscosity and molecular mass, while time had low effect and temperature did not influence the responses evaluated. The optimization results showed that maximum yield (46.04%), intrinsic viscosity (4.89 dL / g) and viscosimetric molecular weight (231.78 kDa) can be obtained using the extraction at temperature of 80 ° C, pH 10 and 90 minutes. In the second chapter, alginates extracted from *Sargassum cymosum* C. Agardh were studied in two different locations along the coast of São Paulo (Ubatuba-ASU and São Sebastião-SSA) and were studied the difference between them in the yield, molecular mass, rheological behavior and antioxidant activity. The yield presented higher values for the alginates of the algae collected in ASS, but the highest molecular weight were observed in the algae of Ubatuba (ASU). The highest antioxidant capacity was observed in ASU alginate, which may be due to the environmental and climatic conditions in which the algae were exposed during its growth. The study of rheological behavior for ASU presented alginates with characteristics of Newtonian fluid, while for ASS, pseudoplastic fluid.

Keywords: Sodium alginate. *Sargassum cymosum* C. Agardh. Optimization. Box Behnken. Antioxidant capacity. Rheological behavior.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
------------------	----

Otimização do processo de extração de alginato de sódio da alga marrom <i>Sargassum cymosum</i> C. Agardh utilizando superfície de resposta.....	14
---	-----------

RESUMO.....	14
-------------	----

INTRODUÇÃO.....	15
-----------------	----

MÉTODOLOGIA.....	20
------------------	----

Processamento e secagem das macroalgas.....	20
---	----

Delineamento experimental e análise dos dados.....	21
--	----

Extração de alginato de sódio.....	22
------------------------------------	----

Determinação da viscosidade intrínseca e Massa Molecular.....	24
---	----

Validação do delineamento.....	25
--------------------------------	----

RESULTADO E DISCUSSÃO.....	26
----------------------------	----

Delineamento experimental da extração de alginato.....	26
--	----

Efeito das variáveis de extração sobre o rendimento de alginato.....	29
--	----

Efeito das variáveis de extração sobre a viscosidade intrínseca e massa molecular.....	30
--	----

Desenvolvimento do modelo e otimização das variáveis experimentais.....	31
---	----

Validação do delineamento.....	34
--------------------------------	----

CONCLUSÃO.....	35
----------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
---------------------------------	----

Influência da posição geográfica na qualidade do alginato de sódio extraído de <i>Sargassum cymosum</i> C. Agardh.....	40
---	-----------

RESUMO.....	40
-------------	----

INTRODUÇÃO.....	40
MÉTODOLOGIA.....	43
Processamento e secagem das macroalgas.....	43
Extração de alginato de sódio.....	44
Determinação da massa molecular.....	45
Determinação atividade antioxidante.....	46
Caracterização reológica do polissacarídeo.....	46
Avaliação ressonância magnética (RMN).....	47
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	47
Rendimento e massa molecular dos alginatos extraídos.....	47
Avaliação da atividade antioxidante dos alginatos extraídos	49
Estudo comportamento reológico dos alginatos extraídos.....;	50
Avaliação ressonância magnética (RMN).....	54
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

INTRODUÇÃO

Polissacarídeos, também conhecidos como hidrocolóides, possuem características que contribuem na viscosidade e geleificação dos produtos (Barbosa-Cânovas et al., 1993), devido a propriedade de reter moléculas de água, e controlar, desse modo, a atividade de água de um sistema (Bobbio; Bobbio, 2003). Esses biopolímeros podem ser encontrados em várias fontes, tais como nas paredes celulares das plantas (celulose, pectina), das algas (carragena, alginato e agarose), em exudatos de plantas (goma arábica e tragacanta) e também podem ser excretados por microorganismos (curdulana, dextranas, xantanas) (Lapasin e Pricl, 1999).

Algas marinhas são umas das principais fontes de polissacarídeos utilizadas atualmente. São seres fotossintéticos no ecossistema, portanto produzem substâncias empregadas em diversos setores da atividade humana, como por exemplo, potentes antioxidantes que são produzidos devido a grande exposição à luz e concentrações consideráveis de oxigênio e CO₂ (Reviere, 2006; Raymundo et al, 2004). Devido ao ambiente em que vivem, as algas desenvolveram uma série de 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 e farmacêutica (Rocha et al, 2007). Também são sintetizados por essas espécies compostos com propriedades funcionais, como por exemplo, ácidos graxos poliinsaturados (Cohen & Vonshak, 1991), pigmentos naturais, minerais essenciais, enzimas, e polissacarídeos (Shahidi e Janak Kamil, 2001; Gomez et al., 2009; Andriamanantoanina et al., 2010; Lorbeer et al., 2015). Esses e outros biocompostos e polissacarídeos vêm sendo pesquisados e processados para possibilitar sua aplicação industrial.

Alginatos são biopolímeros encontrados na parede celular de algas pardas, presentes em muitas regiões costeiras (Mafra Jr e Cunha, 2002). A capacidade de formar géis na presença de cátions bivalentes tais como cálcio, estrôncio, bário e magnésio conferem ao alginato ampla utilização na indústria

alimentícia e farmacêutica (Draget et al., 2005). Na indústria de alimentos são utilizados na produção de sorvetes, produtos lácteos, misturas para bolos, sucos de frutas, e entre outros e na indústria farmacêutica podem ser encontrados em cosméticos, nutracêuticos e medicamentos (Müller et al., 2011, Sellimi et al., 2015)

Para suprir a demanda de alginato, há a necessidade da otimização do processo de extração, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento e preservando a qualidade dos produtos. Para tanto, há ferramentas experimentais que podem ser utilizadas com esta finalidade, tal como o delineamento tipo superfície de resposta Box Behnken (Ferreira et al., 2007; Rodrigues e lemma, 2005).

O ambiente e as condições climáticas em que as algas estão submetidas durante o seu crescimento influenciam no rendimento de extração do alginato (Bertagnolli et al., 2014) e nas propriedades reológicas (Rinaudo, 2008). O estudo da influencia ambiental sobre a atividade antioxidante do alginato de sódio são escassos.

O presente trabalho foi dividido em dois Capítulos. O primeiro consistiu na otimização do processo de extração de alginato de sódio, visando maior rendimento e a obtenção de um produto de elevada qualidade. No segundo foi avaliado a extração de alginato de sódio de algas *Sargassum cymosum* C. Agardh coletados em localidades diferentes, comparando o rendimento, e a viscosidade dos alginatos obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIAMANANTOANINA, H., RINAUDO, M. **Characterization of the alginates from five madagascan brown algae**. Carbohydrate Polymers, n. 82, p. 555–560, 2010.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; KOKINI, J. L.; MA, L.; IBAZ, A. **The rheology of semi liquid food: Advances**. Food and Nutrition Research, n. 39, p. 61-69, 1993.

BERTAGNOLLI, C.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M.; KLEINÜBING, S. J.; TASIC, L.; DA SILVA, M. G. C. (2014). **Sargassum filipendula alginate from Brazil: seasonal influence and characteristics**. Carbohydrate Polymers, n. 111, p. 619-623, 2014.

BOBBIO, P. A.; BOBIO, F. O. **Introdução à Química dos alimentos**, São Paulo, Varela, 2003.

COHEN, Z.; VONSHAK, A. **Fatty acid composition of Spirulina and Spirulina-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy**. Phytochemistry, n. 30, p. 205–206, 1991.

DRAGET, K. I.; SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. **Alginates**. In: Steinbuchel A, Rhee SK (eds) **Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry: Properties, Production, and Patents**. Wiley. Winheim, p. 1-30, 2005.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S., DOS SANTOS, W. N. L. **Box-Behnken desing: Na alternative for the optimization of analytical methods**. Analytica chimica Acta, n. 597, p. 179-186, 2007.

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

LAPASIN, R.; PRICL, S. (1999). **Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications**. Blackie academic e professional, 1999.

LOBEER, 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 fucoïdan and alginate**. Bioresource technology. n. 197, p. 302-309, 2015.

MAFRA JR, L. L., CUNHA, S. R. (2002). **Bancos de *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae) na enseada de armação do Itapocoroy, Penha, SC: Biomassa e rendimento em alginato**. Notas Técnicas Facimar, 6, p. 111-119, 2002.

MÜLLER, J. M., SANTOS, R. L., BRIGIDO, R. V. **Produção de alginato por microrganismos**. Polímeros, V. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. (2004). **Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil)**. Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences, n. 40, p. 4, 2004.

REVIERS, B. de. **Biologia e Filogenia das Algas**. 1ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2006.

ROCHA, F. D., PEREIRA, R. C., KAPLAN, M. A. C., TEIXEIRA, V. L. **Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante**. Revista Brasileira de Farmagnosia, 17, 4, 631-639, 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão, 1ª edição, 2005.

SELLIMI, S.; YOUNES, I.; AYED, H. B.; MAALEJ, H.; MONTERO, V.; RINAUDO, M.; DAHIA, M.; MECHICHI, T.; HAJJI, M.; NASRI, M. **Structural, physicochemical and antioxidante properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed**. International Journal of Biological Macromolecules, n. 72, p. 1358-1367, 2015.

SHAHIDI, F., JANAK KAMIL, Y. (2001). **Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry**. Trends in Food Science and Technology, n. 12, p. 435-464, 2001.

Capítulo 1

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO DA ALGA MARROM *Sargassum cymosum* C.Agardh UTILIZANDO SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

RESUMO

A ampla utilização industrial de alginato de sódio gera a necessidade de processos de extração com maior produtividade e obtenção de produtos de qualidade. O alginato de sódio é um polissacarídeo proveniente de algas marinhas pardas, e é utilizado nas indústrias alimentícias como espessante e gelificante. Para uma eficiente extração de alginato de sódio é necessário a otimização do processo. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência do pH, temperatura e tempo de extração sobre o rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular do alginato de sódio utilizando a metodologia de superfície de resposta baseada no delineamento experimental Box-Benkhen. Os resultados da otimização mostraram que máximo rendimento (46,04%), viscosidade intrínseca (4,89 dL/g) e massa molecular (231,78 kDa) podem ser obtidos utilizando, na extração, a temperatura de 80°C, pH 10 por 90 minutos. Dentre os parâmetros estudados, a maior influência sobre o rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular do alginato extraído foi o pH, enquanto que o tempo apresentou pouca influência no rendimento e a temperatura não mostrou efeito nos parâmetros estudados. Os resultados desse trabalho mostraram que o delineamento utilizado foi adequado para otimização da extração de alginato de sódio de *Sargassum cymosum* C. Agardh.

Palavras chaves: Alginato de sódio. *Sargassum cymosum* C.Agardh. Extração. Otimização. Box Behnken.

1.0. INTRODUÇÃO

As algas marinhas são fontes de vários tipos de polissacarídeos, porém as mais utilizadas para extração destinadas às indústrias são as algas pardas e vermelhas (Cunha et al., 2009). Os polissacarídeos presentes na estrutura de espécies marinhas, tais como algas, possuem funções análoga ao da celulose em plantas. Entretanto, as plantas necessitam de uma estrutura rígida para protegê-las da constante pressão da gravidade, enquanto que as algas precisam ser mais flexíveis para suportar estresses provocados pelas correntes marinhas e ondas (Lapasin e Pricl, 1999).

Na natureza, os polissacarídeos desempenham diferentes funções no organismo em que está presente, podendo atuar como reservas de energias (amido), e contribuindo para integridade estrutural e força mecânica nos tecidos das plantas formando, assim, uma rede hidratada de ligações tridimensionais cruzadas. A pectina faz esse papel em plantas, enquanto que a carragena e alginato em espécies marinhas (Lapasin e Pricl, 1999).

Os polissacarídeos podem ser provenientes de algas (ágar, carragena e alginatos), plantas (galactomananas extraídas das sementes de guar e jataí), biossíntese microbiana (xantana e gelana), exsudados de plantas (goma arábica e tragacanta) e biopolímeros modificados (carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e celulose microcristalina) (Bobbio e Bobbio, 2003; Ma e Barbosa-Cânovas et al., 1993). Aqueles provenientes de algas podem ser encontrados nas algas amarelas-verdes, verdes, vermelhas e marrons. Na Tabela 1 são apresentadas as principais famílias de algas e seus respectivos polissacarídeos. Os alginatos, provenientes de algas pardas (Figura 1), podem ser encontrados em espécies como *Macrocystis pyrifera* (Gomez et al., 2009; McHugh et al., 2001), *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japônica*, *Lessonia nigrescens* (Draget e Taylor, 2011), *Ecklonia radiata* (Lorbeer et al., 2015), *Sargassum sp* (Andriamanantoanina et al., 2010), *Sargassum cymosum* (Mafra Jr e Cunha, 2002), *Sargassum vulgare* (Torres et al, 2007), *Sargassum fusiforme* (Cong et al, 2014) e *Sargassum filipendula* (Bertagnolli et al, 2014).

Tabela 1 – Polissacarídeos de algas e seus respectivos gêneros (Lapasin e Pricl, 1999)

Algas	Polissacarídeos
Amarelas-verdes (Xantofíceas)	Xilanas
Verdes (Clorofíceas)	Mananas
Vermelhas (Rodofíceas)	Carragenas, furcellarana
Marrons (Feofíceas)	Alginatos

No litoral das regiões sul e sudeste do Brasil, o gênero *Sargassum* é mais comumente encontrado e possui uma relevante aplicabilidade como fonte de alginato (Mafra Jr e Cunha, 2002).



Figura 1- Alga parda da espécie *Sargassum sp* (arquivo pessoal)

O alginato possui ampla aplicação industrial devido especialmente à sua capacidade de formar géis na presença de cátions bivalentes tais como cálcio, estrôncio, bário e magnésio (Draget et al., 2005). Na indústria alimentícia podem ser utilizados em sorvetes, produtos lácteos, misturas para bolos e em sucos de frutas, além de outras aplicações. Também possui aplicação na indústria têxtil,

farmacêutica, de cosmético, entre outros (Müller et al., 2011), em imobilização de células, na engenharia de biomateriais, microencapsulação de nutracêuticos e drogas (Sellimi et al., 2015), podendo ser útil, ainda, na prevenção da obesidade, hipercolesterolemia e diabetes (Wang e He, 2010).

Esses polissacarídeos possuem estrutura linear composta por duas unidades monoméricas de ácidos α -L-gulurônicos (G) e β -D-manurônicos (M) com ligações 1-4, que são distribuídos na estrutura em blocos M e G. A razão M/G está relacionada com suas propriedades em solução, por exemplo, longos blocos GG (6 a 10 unidades) conferem ao polissacarídeo estrutura rígida, ou seja, formam géis mais fortes e com maior capacidade de formar complexo com íons divalentes. Assim, o material pode apresentar sequências alternadas de resíduos MG e blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G (Müller et al, 2011; Lapasin e Pricl, 1999). Fertah et al. (2014) estudaram alginatos extraídos da alga *Laminaria digitata*, coletada em Marrocos (África), e obtiveram valores de M/G iguais a 1,12. Torres et al. (2007) obtiveram valores de M/G iguais a 1,27 – 1,56 para alginatos extraídos de *Sargassum vulgare*, coletadas no Ceará (Brasil). Figura 2 apresenta a estrutura química do alginato.

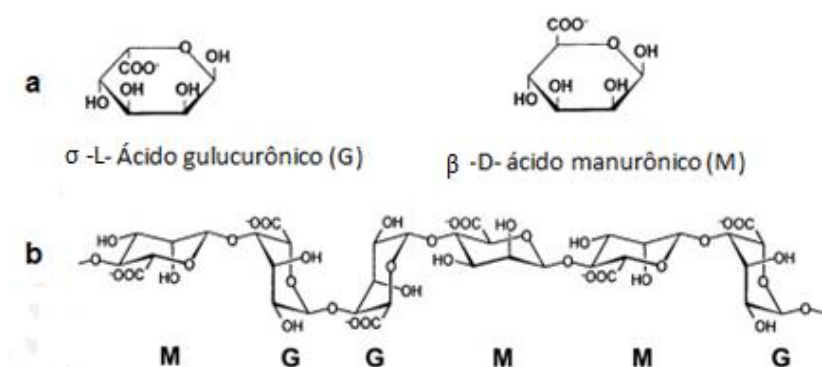


Figura 2- (a) Monômero de alginato, (b) Conformação da cadeia (Draget et al. 2011, modificado)

O alginato também pode ser obtido por culturas de bactérias, que excretam os polissacarídeos no meio de cultura, porém a principal fonte de obtenção de alginato comerciais são as algas marinhas (Müller et al, 2011). No ano de 2015 foi importado 894.456 Kg de ácido alginico e seus sais, o que corresponde a U\$12.338.434 (Alice Web, 2016). A elevada quantidade de

produto importado comprova que o Brasil ainda importa toda demanda utilizada industrialmente (Mafra Jr e Cunha, 2002). Essa dependência pode ser reduzida pela produção nacional do polissacarídeo e, segundo Oliveira (1981), a macroalga *Sargassum*, presente na costa marítima da região Sudeste, poderia servir como matéria-prima para produzir alginatos que apresentam viscosidade média (Torres et al, 2007).

A caracterização de alginato têm sido realizada nos últimos anos, na literatura constam estudos, como exemplo, o rendimento de extração, viscosidade intrínseca e massa molecular (Tabela 2).

Tabela 2- Valores obtidos da caracterização de alginato

Estudos	Espécies	Local	Rendimento (%)	Viscosidade intrínseca (dL/g)	Massa molecular (kDa)
Rahelivao et al. (2013)	<i>Sargassum sp.</i>	Madagascar	-	6,18	451
Torres et al. (2007)	<i>Sargassum vulgare</i>	Brasil	-	4,1 – 6,9	-
	<i>Sargassum dentifolium</i>		-	12,6	606
Larsen et al. (2003)	<i>Sargassum asperifolium</i>	Egito	-	15,2	734
	<i>Sargassum latifolium</i>		-	8,7	416
Adriamantoanina et al. (2010)	<i>Sargassum sp.</i>	Madagascar	23,6 – 26,6	-	-
Bertagnolli et al. (2014)	<i>Sargassum filipendula</i>	Brasil	15,1 - 17,2	-	-

Na literatura há várias metodologias de extração de alginato de sódio que variam principalmente em alguns parâmetros de extração, tais como pH, tempo de extração e temperatura. A extração de alginato de algas marrons é precedida por tratamento com etanol, e ácido clorídrico, que aumenta o rendimento de

extração e remove uma parte dos compostos que influenciam na cor do produto final (McHugh et al, 2001). Após esse processo, ocorre à adição de carbonato de sódio em tempo e temperatura controlada, e posteriormente o alginato é precipitado com etanol (Andriamanantoanina et al., 2010; Mc Hugs et al. 2001; Calumpong et al., 1999; Arvizu Higuera et al., 1997, Perez et al., 1992). Segundo Gomez et al. (2009), a extração do alginato com etanol melhora o rendimento e as propriedades reológicas do produto. É escasso estudos sobre a influência de cada parâmetro de extração no produto final e, devido a grande aplicabilidade do polissacarídeo em processos industriais, há necessidade de otimização do processo de modo a obter um produto com maior qualidade e, também, maior produtividade e rendimento, minimizando custos e tempos. Metodologia de superfície de resposta é uma ferramenta estatística que pode obter as condições ótimas considerando vários fatores simultaneamente (Myers, Montgomery e Anderson-Cook, 2009).

O delineamento Box Behnken (BBD) é um robusto método analítico que permite a estimativa de parâmetros do modelo quadrático e a detecção da falta de ajuste de modelo. Como principais características do Box Behnken podem-se citar a utilização de fatores iguais ou superiores a três, intervalos uniformes entre os níveis de fatores (-1, 0, +1), sendo que o número de experimentos (N) é dado por $N = 2k(k-1) + C$ (onde k número de variáveis e C é o número de replicatas do ponto central) (Bezerra et al., 2008; Ferreira et al., 2007). O desenvolvimento de modelos matemáticos possibilita a avaliação da significância estatística dos fatores utilizados nos estudos, bem como a interação dos efeitos desses fatores (Ferreira et al., 2007; Rodrigues e Lemma, 2005). A função desejabilidade foi inicialmente descrita por Derringer e Suich (1980), que consiste em avaliar a desejabilidade individual da função, podendo variar de 0 até 1 (baixa desejabilidade e alta desejabilidade, respectivamente). Essa ferramenta é comumente utilizada em delineamentos experimentais e em construção de modelos que tem como objetivo avaliar os efeitos de múltiplos fatores e investigar condições ótimas de processos (Myers et al., 2004).

A viscosidade intrínseca é uma medida do volume hidrodinâmico ocupado pela macromolécula em diluição infinita, com um solvente específico, a uma

dada temperatura, sendo dependente da massa molecular, composição e sequência de resíduos M e G (Torres et al, 2007).

As propriedades reológicas de alginatos são fortemente influenciadas tanto pela composição de ácidos urônicos (razão M/G), que é diretamente dependente da época e das condições ecológicas de crescimento de algas (Rinaudo, 2008)

A qualidade do alginato extraído de algas é avaliada em relação a alguns parâmetros como rendimento (Bertagnolli et al, 2014; Lorbeer et al., 2015), massa molecular do polímero (Rahelivao et al, 2013; Fertah et al, 2013, Fawzy et al., 2017), viscosidade intrínseca (Torres et al., 2007; Cong et al., 2014; Fertah et al, 2013). Rahelivao et al. (2013) avaliaram alginato de sódio extraído de três espécies de algas pardas e verificaram que a viscosidade intrínseca de soluções de alginato do gênero *Sargassum* foi superior ao do gênero *Hormophysa*.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar, usando a superfície de resposta, as condições do processo de extração de alginato de sódio de *Sargassum sp* em relação ao rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular. Este estudo se justifica devido à ampla utilização desse polissacarídeo em setores industriais e a necessidade de processos com maiores produtividade e com produtos de qualidade.

2.0. METODOLOGIA

2.1. Processamento e secagem das macroalgas

As algas estudadas foram coletadas do litoral do Estado de São Paulo, na praia Grande em Ubatuba (23°28'00"S – 45°03'36"W), no mês de outubro de 2016. O material coletado foi acondicionado em frascos com água do mar e transportado sob baixa temperatura. Primeiramente foi feita a triagem das algas em água corrente, separando-as de quaisquer organismos exógenos a elas. Após limpeza prévia, estas foram sanitizadas com água clorada (25 ppm)

durante 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado, em centrífuga doméstica, 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. Delineamento experimental e análise dos dados

A metodologia de Superfície de Resposta, usando o delineamento experimental Box-Behnken (BBD), foi escolhida para avaliar e otimizar a influência dos parâmetros de extração de alginato de sódio. As variáveis independentes do delineamento foram pH (X1), temperatura (X2) e tempo de extração (X3), enquanto que as dependentes foram rendimento, massa molecular e viscosidade intrínseca. Foram realizados 15 experimentos, sendo três replicatas no ponto central, avaliando a interação entre as diferentes variáveis de extração (Tabela 1). Os limites das variáveis independentes foram definidos a partir de estudos prévios que realizaram extração de alginato de algas pardas (Bertagnolli et al., 2014; Andriamanantoanina et al., 2010; Davis et al., 2004; McHugs et al., 2001).

O modelo polinomial quadrático (Equação 1) foi utilizado para prever as respostas observadas (rendimento, massa molecular viscosimétrica e viscosidade intrínseca) em função dos parâmetros de extração.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação 1}$$

Onde Y é a resposta predita; X_i e X_j são as variáveis independentes; 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 através da análise da variância (ANOVA) e a qualidade do ajuste do

modelo polinomial aos dados experimentais foi fornecido através do coeficiente de determinação (R^2) e sua significância pelo teste F. As análises dos delineamentos experimentais e os cálculos das respostas preditas foram realizadas utilizando o software DESIGN EXPERT 10 (StatEaselInc. Minneapolis, USA).

2.3. Extração em alginato

O processo foi realizado através da metodologia modificada de McHugh et al. (2001) e com os parâmetros otimizados por Lorbeer et al. (2015) na etapa de tratamento ácido. Para cada tratamento, 6 g de alga em pó foram imersas em etanol e agitada em shaker por 3 horas, a 250 rpm. 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 adição de ácido clorídrico 0,1 M, até pH 2,0, a 45 °C por 110 minutos, sob agitação de 250 rpm. As amostras foram lavadas com água destilada e, nestas, foi realizada a otimização das condições de extração. Primeiramente, foi adicionado carbonato de sódio 2%, até atingir o pH desejado (pH 8, 9 e 10), em diferentes tempos (90, 195 e 300 minutos), nas temperaturas de 50, 65 e 80 °C, sob agitação. A solução foi filtrada repetidamente até a retirada das impurezas. Para a separação do alginato de sódio, foi adicionado à solução etanol (1:2, v/v), precipitando o produto desejado, que foi separado por centrifugação (3000 rpm) e seco em estufa à 45 °C por 15 horas, para a obtenção do alginato de sódio. O fluxograma do processo utilizado nesse estudo está apresentado na Figura 3.

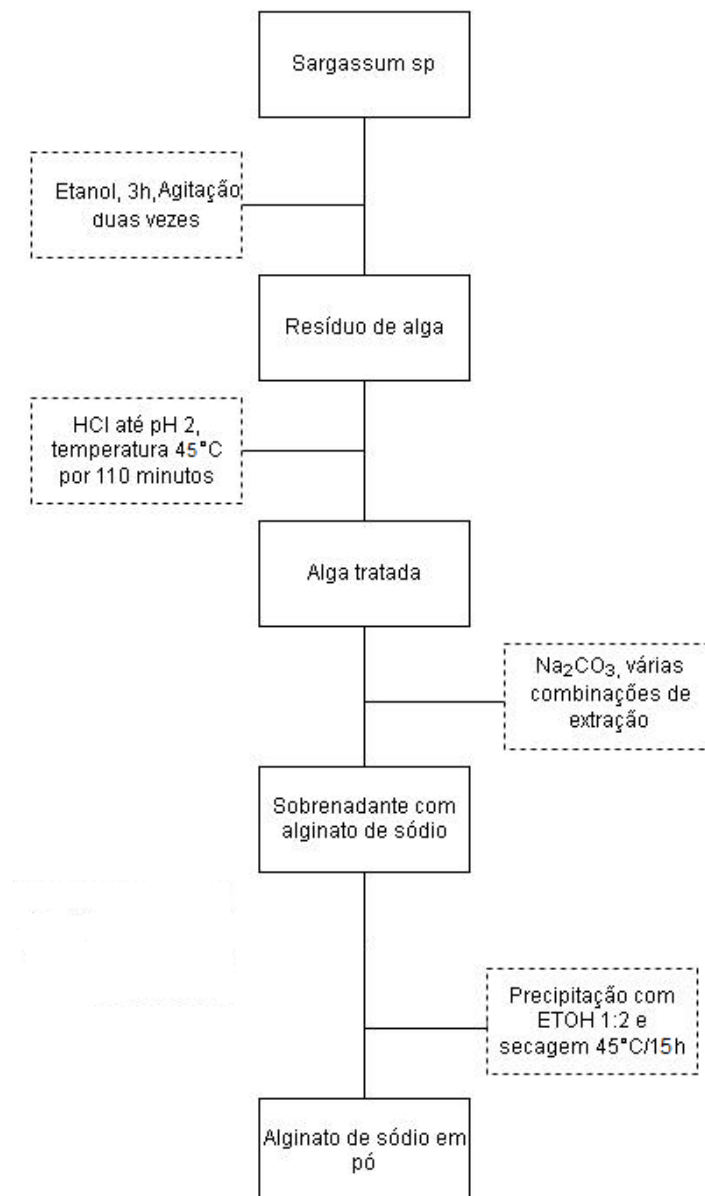


Figura 3- Fluxograma do processo de extração do alginato.

O rendimento do alginato de sódio foi calculado seguindo a Equação 1, sendo a umidade do material determinada, em triplicata, em estufa a 105°C até peso constante.

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

Equação 1

Os dados experimentais foram analisados pela análise de regressão quadrática e os modelos foram analisados por Análise de variância (ANOVA) e a significância foi avaliada por F-teste em níveis de probabilidade ($p \leq 0,05$). O modelo é considerado aceitável quando atinge 95% de significância ($P_S < 0,05$), com valores de falta de ajuste insignificante ($P_L > 0,05$) e o coeficiente de correlação alto ($R^2 \geq 0,8$) (Lundstedt et al., 1998; Lorbeer et al., 2015). A análise estatística foi realizada usando o software software DESING EXPERT 10 (StatEaseInc. Minneapolis, USA).

2.4. Determinação da viscosidade intrínseca e massa molecular

A viscosidade intrínseca de soluções de alginato foi determinada utilizando viscosímetro capilar Cannon-Fensk, mantido em banho termostático a 25 °C. Soluções do polissacarídeo foram preparadas nas concentrações (C) de 0,05 – 0,6 g/L (Martinsen, Skjak-Braek e Smidsrod, 1991), tendo como solvente solução de NaCl 0,1 M (Martinsen, Skjak-Braek e Smidsrod, 1991; Mancini et al, 1996). A viscosidade intrínseca do polissacarídeo foi determinada usando a expressão empírica de Huggins (Equação 2). O valor da viscosidade intrínseca será avaliado pela extrapolação da reta obtida à concentração zero, pois segundo a teoria de Huggins, a baixas concentrações conforme a relação:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)_{C=0} + K_H \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)_{C=0}^2 C$$

Equação 2

onde K_H é o coeficiente de Huggins ou coeficiente de interação, η_{sp} é a viscosidade específica e η_{sp}/C é a viscosidade reduzida (Torres et al., 2007). O cálculo da massa molecular do polímero foi determinado a partir da equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 3).

$$[\eta] = kM_v^\alpha \quad \text{Equação 3}$$

onde η é a viscosidade intrínseca (dL/g), M_v é a massa molecular viscosimétrica média (kDalton) e k e α são constantes viscosimétricas que dependem da natureza do solvente, da temperatura e da estrutura química do polímero. Clemente et al. (1998) propôs uma equação empírica para determinação de massa molecular de alginato, onde K é 0,023 dL/g e α é 0,984. Esta equação também foi utilizada para determinação da massa molecular do alginato extraído de algas marrons dos gêneros *Sargassum vulgare* (Torres et al., 2007) e *Laminaria digitata* (Fertah et al., 2014).

2.5. Validação do delineamento

A partir dos resultados de otimização obtidos pela Superfície de Resposta, assim como da função desejabilidade, foi realizada a validação do processo de extração do alginato de sódio. Desejabilidade foi utilizada para determinar a condição mais desejável para a extração otimizada de alginato de sódio. A função desejabilidade foi inicialmente descrita por Derringer e Suich (1980), que consiste em avaliar a desejabilidade individual da função, podendo variar de 0 até 1 (baixa desejabilidade e alta desejabilidade, respectivamente), resumindo os resultados de uma superfície de resposta a uma única equação. A desejabilidade global foi determinada pela Equação 5, em que utiliza as desejabilidade individuais de cada resposta combinadas em uma única resposta. Foi realizada extração com a condição predita pelo delineamento experimental e comparado os valores preditos e reais.

$$D = (d_1 (Y_1) \times d_2 (Y_2) \times \dots \times d_k (Y_k))^{1/k} \quad \text{Equação 5}$$

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

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Delineamento experimental da extração de alginato

Os resultados de rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular, obtidas nas diferentes condições de extração do alginato de sódio são apresentados na Tabela 3. A umidade da alga obtida foi de 14,01%, utilizada nos cálculos de rendimento.

Na Figura 4 é apresentado as soluções de alginatos, obtidas conforme delineamento experimental Box-Benkhen, onde pode ser verificado a influência dos parâmetros de extração na cor da solução do polissacarídeo. Dentre as variáveis estudadas, o aumento do pH ocasionou a obtenção das soluções mais clara (amostras 1, 8, 12 e 15 foram obtidas em pH 10). A obtenção de soluções de alginatos mais claros para pH mais elevados pode ser devido a maior quantidade de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em solução. Para as maiores temperaturas de extração foi possível verificar que as soluções ficaram mais escuras, podendo ter ocorrido a reação de Maillard no alginato extraído.

Tabela 3- Delineamento experimental do processo de extração e as respostas obtidas

Extração	Temperatura (°C)	X ₁	Tempo (min)	X ₂	pH	X ₃	Rendimento (%)	Viscosidade intrínseca (dL/g)	Massa molecular (KDa)
1	65	0	90	-1	10	1	46,66	4,92	233,31
2	65	0	195	0	9	0	9,83	2,6	121,92
3	65	0	195	0	9	0	6,81	2,25	105,22
4	65	0	300	1	8	-1	7,1	3,17	148,92
5	65	0	90	-1	8	-1	5,79	1,67	77,86
6	80	1	300	1	9	0	9,22	2,71	127,21
7	80	1	90	-1	9	0	7,7	4,23	199,74
8	65	0	300	1	10	1	40,7	2,98	139,82
9	50	-1	90	-1	9	0	4,42	3,42	161,09
10	50	-1	300	1	9	0	6,15	3,39	159,68
11	80	1	195	0	8	-1	8,3	2,94	138,23
12	50	-1	195	0	10	1	32,61	4,3	203,21
13	50	-1	195	0	8	-1	5,51	2,52	118,07
14	65	0	195	0	9	0	8,65	2,51	117,64
15	80	1	195	0	10	1	51,84	2,44	114,19

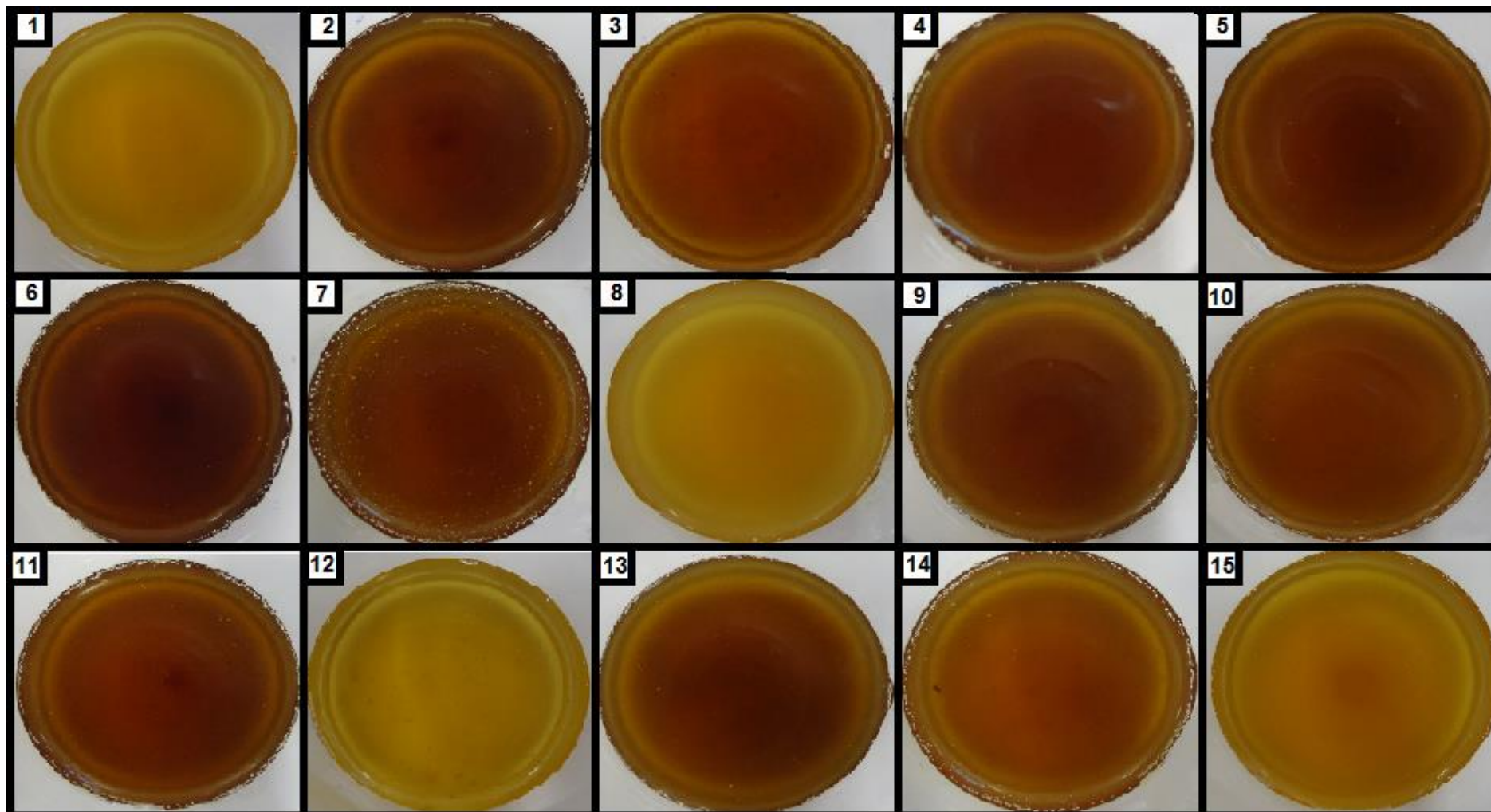


Figura 4- Soluções de alginatos de sódio extraídos em diferentes condições de temperatura, pH e tempo de extração, conforme delineamento experimental Box Benkhen (Vide Tabela 3).

4.2. Efeito das variáveis de extração sobre o rendimento de alginato

Os rendimentos dos alginatos de sódio extraídos podem ser observados na Tabela 1, onde verifica-se o máximo de rendimento de 51,84%, referente a extração 15 (80 °C, pH 10.00 e 195 min.), enquanto que o menor foi de 4,42%, referente a extração 9 (50 °C, pH 9 e 90 min.). Andriamantoanina et al. (2010) obtiveram rendimentos de alginato de sódio de algas *Sargassum sp*, provenientes de duas localidades diferentes em Madagascar de 23,60% e de 26,6%. Bertagnolli et al. (2014), estudando alginatos de sódio extraído de algas brasileiras, coletadas no litoral de São Paulo em diferentes estações do ano, obtiveram rendimentos na faixa de 15,1 – 17,2%. Mazumder et al. (2016) otimizaram a extração de alginato de *Sargassum muticum* e obtiveram 13,47% como maior rendimento, referente a temperatura de extração 80 °C. Desta forma, os rendimentos obtidos no presente estudo se mostraram muito satisfatórios.

Os resultados obtidos mostram forte influência do pH no rendimento da extração, ou seja, quanto mais elevado o pH, maior a quantidade de polissacarídeo extraído. O tempo possui baixa influência no rendimento da extração, enquanto que a temperatura não mostrou um efeito significativo quanto ao aumento da extração de alginato, dentro da faixa estudada. Fawzy et al. (2017) otimizaram a extração de alginato de *Sargassum latifolium* considerando outros parâmetros de extração (temperatura de 25-45°C, tempo 1-3 horas e 20, 40 e 60 ml/g de solução Na₂CO₃) e verificaram que o tempo de extração foi a variável que mais influenciou o rendimento de extração de alginato. As superfícies de resposta (Figura 5) ilustram a influência das variáveis independentes de pH, tempo e temperatura sobre os rendimentos de alginato de sódio. O delineamento experimental prediz o máximo de rendimento (49,48%) quando utilizado na extração temperatura de 80 °C, tempo de 228,75 min. e pH 10, com desejabilidade de 0,95.

4.3. Efeito das variáveis de extração sobre a viscosidade intrínseca e massa molecular

O máximo valor obtido para viscosidade intrínseca (4,92 dL/g) e massa molecular (233,31 kDa) foi observado na extração 1 (65 °C, pH 10 por 90 min.), enquanto que o menor valor de viscosidade intrínseca (1,67 dL/g), e respectiva massa molecular (77 kDa), é referente a extração 5 (65 °C, pH 8 por 90 minutos). Os resultados mostram que o pH possui maior influência na viscosidade intrínseca e massa molecular do alginato extraído do que o tempo e temperatura, ilustrado na superfície de resposta gerada pelo delineamento (Figura 5). A extração a temperaturas mais altas reduz a densidade e a viscosidade do alginato (Fawzy et al., 2017), no entanto, para a faixa de temperatura estudada o efeito de redução da viscosidade não foi relevante. Rahelivao et al. (2013) avaliaram *Sargassum sp.* de Madagascar e obtiveram viscosidade intrínseca igual a 6,18 dL/g e massa molecular 451500 g/mol (451 kDa), valores maiores que obtidos no presente trabalhos. Alguns valores encontrados de viscosidade intrínseca estão dentro da faixa encontrada por Torres et al. (2007) que extraíram alginato de *Sargassum vulgare* coletada no Brasil (4,1 e 6,9 dL/g). Larsen et al. (2003) também obtiveram maiores valores de viscosidade intrínseca e massa molecular de *Sargassum dentifolium* (12,6 dL/g, 606 kDa), *Sargassum asperifolium* (15,2 dL/g, 734 kDa) e *Sargassum latifolium* (8,7 dL/g, 416 kDa), tais características são fortemente influenciadas pelo ambiente em que vivem também pela subespécie da macroalga (Lapasin e Pricl, 1999). O máximo de viscosidade intrínseca predito pelo delineamento (5,28 dL/g) pode ser atingido nas condições de extração de 52 °C, pH 9,96 por 94 min, com desejabilidade igual a 1,00. Para a obtenção de maior massa molecular (234,94 kDa) foi predito extração a 53,30°C, pH 9,89 por 100 min, com desejabilidade igual a 1,00.

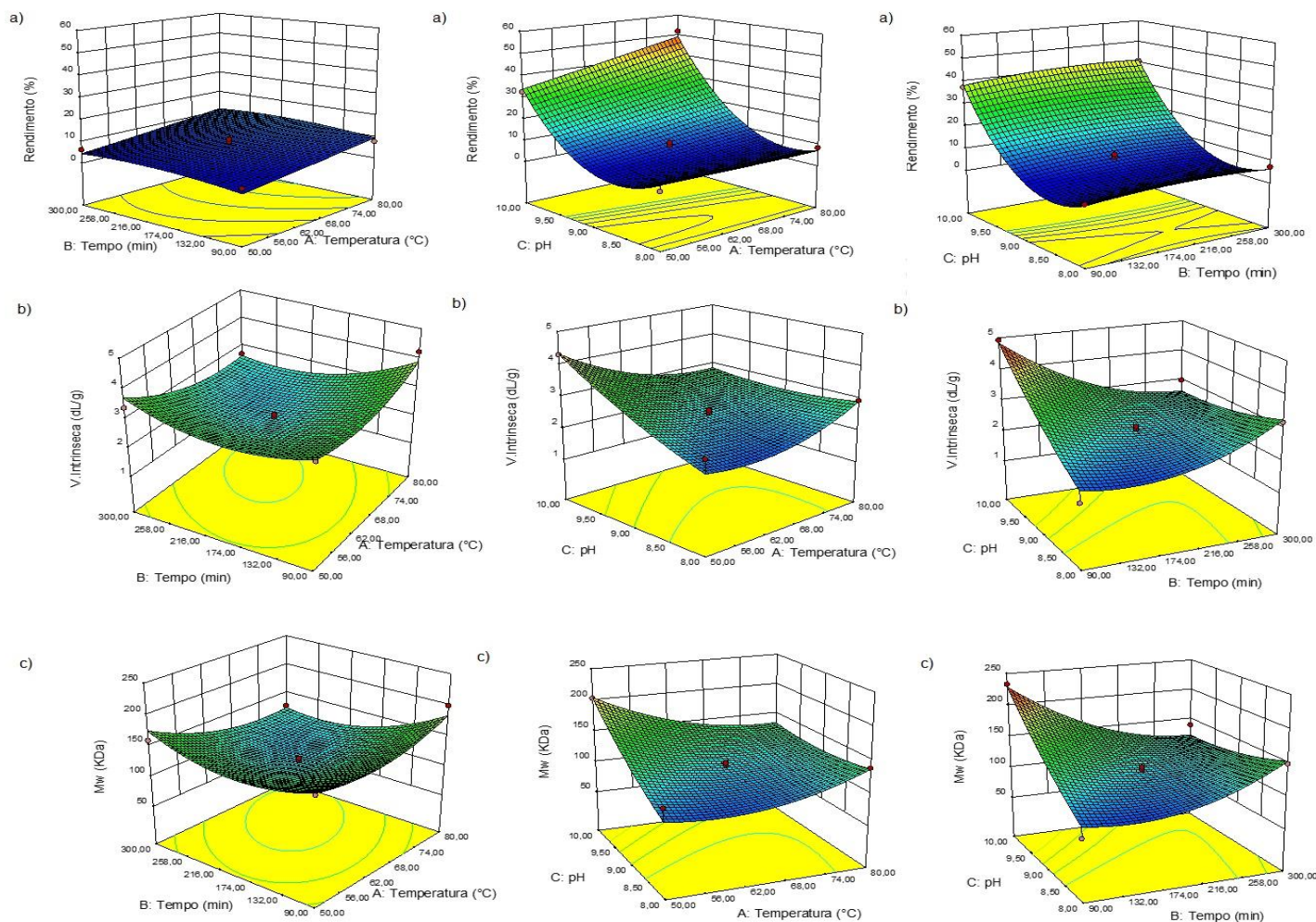


Figura 5 – Superfície de resposta mostrando a influência do Tempo, Temperatura e pH sobre o **a)** Rendimento, **b)** Viscosidade intrínseca (V. intrínseca) e **c)** Massa molecular (Mw) do alginato extraído.

4.4. Desenvolvimento do modelo e otimização das variáveis experimentais

Análise de múltipla regressão foi utilizada aos dados obtidos pelo delineamento (Tabela 3), e a relação entre as variáveis independentes e respostas foi descrita pela equação polinomial de segunda ordem. Três modelos empíricos foram desenvolvidos nesse estudo para predição de rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular (Tabela 4).

Tabela 4- Coeficientes do modelo quadrático

Y	Intercepção	A	B	C	A ²	B ²	C ²	A*B	A*C	B*C
Rendimento alginato (%)	8,43	3,55*	0,99	16,98*	0,13	-1,69	16,00*	-0,052	4,11*	0,50
Viscosidade intrínseca (dL/g)	2,45	0,16	-0,25	0,54*	0,42	0,56	0,17	-0,37	-0,57*	-0,86*
Massa molecular (kDa)	114,93	-7,84	-12,05	25,93*	20,23	26,78	8,27	-17,78	-27,30*	-41,14*

A equação é do tipo: $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$

* P < 0,05

A: temperatura; B: tempo; C: pH.

Análise de variância (ANOVA) foi calculada e usada para verificar a adequação e o ajuste do modelo (Tabela 5) quadrático aos dados experimentais. O alto valor de F (48,96) e baixo valor de p-valor (0,0002) indica que o modelo quadrático é altamente significativo e adequado para descrever a resposta rendimento. Para a viscosidade intrínseca e massa molecular, o modelo foi significativo e o teste de falta de ajuste apresentou-se insignificante ($p < 0,05$) para as três respostas, portanto demonstrou um bom ajuste e predição de respostas adequadas para os fatores aplicados.

Os valores do coeficiente de determinação (R^2) foram utilizados para verificar o ajuste do modelo baseado ao delineamento experimental Box-Behnken. Todas as respostas do delineamento apresentaram altos valores de R^2 (rendimento: 0,98, viscosidade intrínseca: 0,91 e massa molecular: – 0,91).

Tabela 5- Análise de variância (ANOVA) para superfície de resposta do modelo quadrático da extração de alginato de sódio de *Sargassum cymosum* C.Agardh

	Coeficiente estimado	Soma dos Quadrados	df	Valor Eficaz	Valor F	p-valor Prob > F
Rendimento alginato (%)						
Modelo		3463,16	9	384,8	48,96	0,0002
A-Temperatura	3,55	100,61	1	100,61	12,8	0,0159
B-Tempo	0,99	7,78	1	7,78	0,99	0,3654
C-pH	16,98	2305,88	1	2305,88	293,41	< 0,0001
AB	-0,052	0,011	1	0,011	1,40E-03	0,9716
AC	4,11	67,57	1	67,57	8,6	0,0326
BC	0,5	1	1	1	0,13	0,7359
A ²	0,13	0,064	1	0,064	8,09E-03	0,9318
B ²	-1,69	10,53	1	10,53	1,34	0,2993
C ²	16	945,67	1	945,67	120,33	0,0001
Residual		39,29	5	7,86		
Falta de ajuste		34,66	3	11,55	4,99	0,1715
Pure Error		4,63	2	2,32		
Cor Total		3502,45	14			
R-Quadrado		0,9888				
Viscosidade Intrinseca (dL/g)						
Modelo		9,61	9	1,07	5,78	0,0339
A-Temperatura	2,45	0,21	1	0,21	1,16	0,3306
B-Tempo	-0,16	0,5	1	0,5	2,68	0,1627
C-pH	-0,25	2,35	1	2,35	12,74	0,0161
AB	0,54	0,56	1	0,56	3	0,1437
AC	-0,37	1,3	1	1,3	7,03	0,0453
BC	-0,57	2,96	1	2,96	16	0,0103
A ²	-0,86	0,67	1	0,67	3,6	0,1162
B ²	0,42	1,16	1	1,16	6,25	0,0544
C ²	0,56	0,11	1	0,11	0,59	0,4766
Residual	0,17	0,92	5	0,18		
Falta de ajuste		0,86	3	0,29	8,66	0,1053
Pure Error		0,066	2	0,033		
Cor Total		10,54	14			
R-quadrado		0,9123				
Massa molecular (kDa)						
Modelo		22008,66	9	2445,41	5,84	0,0332
A-Temperatura	-7,84	491,1	1	491,1	1,17	0,3283
B-Tempo	-12,05	1160,9	1	1160,9	2,77	0,1568
C-pH	25,93	5379,44	1	5379,44	12,84	0,0158
AB	-17,78	1264,51	1	1264,51	3,02	0,1428
AC	-27,3	2980,07	1	2980,07	7,11	0,0445
BC	-41,14	6769,18	1	6769,18	16,16	0,0101
A ²	20,23	1510,4	1	1510,4	3,61	0,116
B ²	26,78	2647,59	1	2647,59	6,32	0,0536
C ²	8,27	252,71	1	252,71	0,6	0,4725
Residual		2094,47	5	418,89		
Falta de ajuste		1943,98	3	647,99	8,61	0,1058
Pure Error		150,49	2	75,24		
Cor Total		24103,13	14			
R-Squared		0,9131				

4.5. Validação do delineamento

A validação do delineamento experimental do processo de extração foi realizada visando otimização simultânea dos valores máximos de rendimento (46,04%), viscosidade intrínseca (4,89 dL/g) e massa molecular (231,78 kDa). Os valores das variáveis independentes que otimizaram os valores de resposta do processo de extração do alginato foram pH 10,0, temperatura de 80 °C durante 90 min., com desejabilidade igual a 0,952. O valor de desejabilidade é dado dentro de uma faixa aceitável ($0 \leq d \leq 1$), sendo que o valor 0 corresponde ao menor rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular da extração, enquanto que 1, ao valor máximo para tais respostas. Quanto maior a desejabilidade, mais adequada é a resposta do delineamento, ou seja, o seu valor máximo (1) é a condição otimizada do sistema. A extração foi realizada na condição determinada nos parâmetros citados, sendo obtidos, respectivamente, para rendimento, viscosidade intrínseca e massa molecular: 45,79%, 6,93 dL/g, 330,35 kDa. O resultado de rendimento obtido na extração foi bem próximo ao valor predito no trabalho, porém os valores de viscosidade intrínseca e massa molecular foram superiores ao esperado, que pode ser devido a uma pequena variação de pH durante a extração e também podem ter ocorridos variações durante as análises. A metodologia utilizada para a determinação pode ser fonte de erros, já que esta depende do ambiente em que está sendo realizada a análise e da experiência do manipulador. Apesar do aumento da massa molecular, o que é desejável no presente estudo, a confirmação dos resultados obtidos nos experimentos mostrou uma boa relação com os valores preditos, indicando adequação da aplicação do modelo quadrático. Fawzy et al. (2017) também aplicaram a função desejabilidade para otimização da extração de alginato de sódio e obtiveram desejabilidade igual a 0,778 e os resultados da validação foram bem próximos ao dos preditos no experimento. Portanto, o delineamento Box-Behnken utilizado apresentou – se eficiente quando utilizado para a otimização de alginato de sódio de *Sargassum cymosum* C.Agardh.

5.0. CONCLUSÃO

A metodologia de superfície de resposta (RSM) empregando o delineamento Box-Behnken (BBD) foi adequada para a extração do alginato de sódio da macroalga *Sargassum cymosum* C.Agardh.

As condições ótimas de extração para um maior rendimento de alginato (51,84%) foram 80°C, pH 10 e 195 minutos, enquanto que o menor (4,42%) foi a 50°C, pH 9 e 90 min. Os resultados relacionados ao rendimento de extração mostraram forte influência do pH e baixa influência do tempo e temperatura, que não mostraram efeito significativo no rendimento de alginato, dentro da faixa estudada.

A obtenção de maior viscosidade intrínseca (4,92 dL/g) e massa molecular (233,31 kDa) foi observado na extração a 65°C, pH 10 por 90 min., enquanto que o menor valor (1,67 dL/g; 77 kDa) foi em 65°C, pH 8 durante 90 min. Os resultados mostram que o pH possui maior influência na viscosidade intrínseca e massa molecular do alginato extraído do que o tempo e temperatura.

O máximo de rendimento (46,04%), de viscosidade intrínseca (4,89 dL/g) e massa molecular (231,78 kDa) foram preditos para a extração a temperatura de 80°C, pH 10 e 90 min.

A validação comprovou a efetividade da utilização da metodologia de delineamento Box-Behnken para a otimização da extração de alginato de sódio, com valor de desejabilidade da maximização dos parâmetros preditos de 0,952.

6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alice Web- Análise das informações de comércio exterior via web. Available from: aliceweb.mdic.gov.br//consultar-ncm/consultar

ANDRIAMANANTOANINA, H., RINAUDO, M. **Characterization of the alginates from five madagascan brown algae**. Carbohydrate Polymers, v. 82, p. 555–560, 2010.

ARVIZU-HIGUERA, D. L., HERNÁNDEZ-CARMONA, G., RODRÍGUEZ-MONTESINOS, Y. E. **Efecto del tipo de precipitación en el proceso de obtención de alginato de sodio: método de alginato de calcio y método de ácido algínico.** *Ciencias Marinas*, v. 23, n.2, p. 195–207, 1997.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; KOKINI, J. L.; MA, L.; IBAZ, A. **The rheology of semi liquid food: Advances.** *Food and Nutrition Research*, v. 39, p. 61-69, 1996.

BERTAGNOLLI, C.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M.; KLEINÜBING, S. J.; TASIC, L.; DA SILVA, M. G. C. **Sargassum filipendula alginate from Brazil: seasonal influence and characteristics.** *Carbohydrate Polymers*, v. 111, p. 619-623, 2014.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, I. S.; ESCALEIRA, I. A. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.** *Talanta*, v.76, p. 965-977, 2008.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à Química dos alimentos**, São Paulo, *Varela*, 2003.

CALUMPONG, P.H., MAYPA, P.A., MAGBANUA, M. **Population and alginate yield and quality assessment of four Sargassum species in Negros Island, central Philippines,** *Hydrobiologia*, v. 398, p. 211–215, 1999.

CONG, Q.; XIAO, F.; LIAO, W.; DONG, Q.; DING, K. **Structure and biological activities of na alginate from Sargassum fusiforme, and its sulfated derivative.** *International Journal of Biological Macromolecules*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.056>, 2014.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C.; FEITOSA, J. **Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DAVIS, T. A.; RAMIREZ, M.; MUCCI, A.; LARSEN, B. **Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from Sargassum spp.** *Journal of Applied Phycology*, v. 16, p. 275–284, 2004.

DERRINGER, G; SUICH, R. **Simultaneous-optimization of several response variables.** *Journal of Quality Technology*, v. 12, p. 214. 219, 1980.

DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJAK-BRÆK, G. **Alginates.** In: Steinbüchel A, Rhee SK (eds) **Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry: Properties, Production, and Patents.** Wiley. Weinheim, p. 1-30, 2005.

FAWZY, M. A.; GOMAA, M.; HIFNEY, A. F.; ABDEL-GAWAD, K. M. **Optimization of alginate alkaline extraction technology from Sargassum latifolium and its potential antioxidant and emulsifying properties.** *Carbohydrate polymers*, v. 157, p. 1903-1912, 2017.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S., DOS SANTOS, W. N. L. **Box-Behnken desing: Na alternative for the optimization of analytical methods.** Analytica chimica Acta, v. 597, p 179-186, 2007.

FERTAH, M.; BELFKIRA, A.; DAHMANE, E.; TAOURIRTE, M.; BROUILLETTE, F. **Extraction and characterization of sodium alginates from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed.** Arabian Journal of Chemistry, v. 10, p. 1-10, 2013.

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

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications.** Blackie academic e professional, 1999.

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 Res, v. 338, p. 2325–2336, 2003.

LORBEER, A. J.; LAHNSTEIN, J.; BULONE, V.; NGUYEN, T.; ZHANG, W. **Multiple-response opmization 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.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, Å.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. **Experimental design and optimization.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 42 (1), p. 3–40, 1998.

MA, L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Rheological properties of food gums and food gum mixtures.** Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment., v. 33, n. 2, 133-163, 1993.

MAFRA JR, L. L.; CUNHA, S. R. **Bancos de *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae) na enseada de armação do Itapocoroy, Penha, SC: Biomassa e rendimento em alginato.** Notas Técnicas Facimar, v. 6, p. 111-119, 2002.

MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. **Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates.** Journal of food Engineering, v. 28, p. 283-295, 1996.

MARCOTTE, M.; TAHERIAN, A. R.; RAMASWAMY, H. S. **Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature.** Food Research International, v.34, n.8, p.695-703, 2001.

MARTINSEN, A.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O. **Comparasion of different methods for determination of molecular weight and molecular**

weight distribution of alginates. Carbohydrate Polymers, v. 15, p. 171-193, 1991.

MAZUMDER, A.; HOLDT, S. L.; DE FRANCISCI, D.; ALVARADO-MORALES, M.; MISHRA, H. N.; ANGELIDAKI, I. **Extraction of alginate from *Sargassum muticum*: Process optimization and study of its functional activities.** Journal of Applied Phycology, v. 28, n. 6, p. 3625-3624, 2016.

McHUGH, D. J.; HERNANDEZ-CARMONA, G.; ARVIZU-HIGUERA, D. L.; RODRIQUEZ-MONTESINOS, Y. E. **Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*: Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid.** Journal of Applied Phycology, v. 13, p. 471–479, 2001.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. **Produção de alginato por microrganismos.** Polímeros, v. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.

MYERS, R.; MONTGOMERY, D.; VINING, G.; BORROR, C. M.; KOWALSKI, S. M. **Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey.** Journal of Quality Technology, v.36, n.1, p. 53-77, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, E. de. **A exploração de algas marinhas no Brasil: Situação actual e perspectivas futuras.** Phycology latino-americano, v. 1, p. 5–18, 1981.

PÉREZ, R.; KAAS, R.; CAMPELLO, F.; ARBAULT, S.; BARBAROUX, O. **La culture des algues marines dans le monde.** Editions IFREMER, Plouzané, France, p. 613, 1992.

RAHELIVAO, M. P.; ANDRIAMANANTOANINA, H.; HEYRAUD, A.; RINAUDO, M. **Structure and properties of three alginates from Madagascar seacoast algae.** Food Hydrocolloids, v.32, n.1, p.143-146, 2013.

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas;** tradução Iara Maria Franceschini. Porto Alegre, Artmed, p. 182-195, 2006.

RINAUDO, M. **Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials.** Polymer International, v.57, p.397–430, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos.** Casa do Pão, 1ª edição, 2005.

SELLIMI, S.; YOUNES, I.; AYED, H. B.; MAALEJ, H.; MONTERO, V.; RINAUDO, M.; DAHIA, M.; MECHICH, T.; HAJJI, M.; NASRI, M. **Structural, physicochemical and antioxidante properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 72, p. 1358-1367, 2015.

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.

WANG, T.; HE, N. **Preparation, characterization and applications of low-molecular-weight alginate-oligochitosan nanocapsules.** Nanoscale, v. 2, p. 230–239, 2010.

Capítulo 2

INFLUÊNCIA DA POSIÇÃO GEOGRÁFICA NA QUALIDADE DO ALGINATO DE SÓDIO EXTRAÍDO DE *Sargassum cymosum* C.Agardh

RESUMO

A necessidade das indústrias alimentícias em produzir alimentos de qualidade com menor custo estimula o estudo de novas fontes de matéria prima. O Brasil depende de importações para suprir a demanda de alginato de sódio utilizado nos produtos brasileiros. Alginato de sódio possui ampla utilização industrial, devido à sua capacidade em formar géis, e é encontrado em algas pardas do gênero *Sargassum cymosum* C.Agardh. Considerando a influência que as condições ambientais exercem no metabolismo dos organismos, o objetivo do trabalho foi estudar a diferença entre alginatos extraídos de algas coletadas em localidade diferentes do litoral de São Paulo. O rendimento de alginato foi maior para as algas coletadas em São Sebastião/SP (ASS), enquanto que maiores valores de massa molecular e capacidade antioxidante foram verificados nas algas coletadas em Ubatuba/SP (ASU). O comportamento reológico para as algas ASS apresentaram características de fluido newtoniano, enquanto para ASU fluido pseudoplástico. Os resultados comprovaram a influência do ambiente e condições climáticas no crescimento da alga.

Palavras chaves: Alginato de sódio. *Sargassum cymosum* C.Agardh. Massa molecular. Capacidade antioxidante. Comportamento reológico.

1.0. INTRODUÇÃO

Dentre os mais importantes organismos fotossintéticos do ecossistema, estão representadas as algas marinhas, devido à alta incidência de luz e concentrações consideráveis de oxigênio e CO₂ a produção de potentes

oxidantes é estimulada (Raymundo et al, 2004). O ambiente em que vivem influencia o desenvolvimento de uma série de mecanismos fisiológicos e biomoleculares de defesa contra os efeitos das espécies reativas do oxigênio, devido a isso elas são uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais para a indústria alimentícia e farmacêutica (Rocha et al, 2007). As condições ambientais como, por exemplo, salinidade, incidência de raios solares, pH, quantidade de sais dissolvidos, temperatura e outras variações sazonais, influenciam diretamente na quantidade de produção de biocompostos, devido a influência que todos esses fatores exercem sobre o metabolismo dos organismos (Campos et al., 2014). Biocompostos e polissacarídeos extraídos de algas vêm sendo estudados para possíveis aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica, devido a capacidade dessas espécies em sintetizar uma grande quantidade de compostos com propriedades funcionais como ácidos graxos poliinsaturados (Cohen e Vonshak, 1991), pigmentos naturais, minerais essenciais, enzimas, peptídeos bioativos e polissacarídeos (Shahidi e Janak Kamil, 2001; Ross et al., 2008).

Polissacarídeos, também conhecidos como hidrocolóides, são polímeros de monossacarídeos e são compostos de unidade glicosil em arranjo lineares, possuem mais de 20 unidades monossacarídicas. Atuam na viscosidade e geleificação de diversos produtos, e também atuam na modificação e/ou controle das propriedades de fluxo e a textura de produtos líquido, bem como nas propriedades de deformação de produtos semi-sólidos (Damodaran, Park e Fennema, 2010; Ma e Barbosa-Cânovas, 1993). Tais propriedades são essenciais para diversos setores industriais, como formar soluções coloidais, devido à propriedade de reter moléculas de água, e controlar, desse modo, a atividade de água de um sistema (Bobbio; Bobbio, 2003).

Nas algas pardas presentes nas regiões costeiras no mar podem se extraídos o alginato (Müller et al, 2011). Esse polissacarídeo possui ampla aplicação industrial devido as suas propriedades de espessamento de soluções aquosas, assim como agente dispersante e estabilizante de emulsões e suspensões, em virtude à sua capacidade de formar géis na presença de cátions bivalentes tais como cálcio, estrôncio, bário e magnésio (Draget et al., 2005). Estas propriedades são importantes em muitas aplicações industriais, como na

indústria de alimentos (sorvetes, produtos lácteos, misturas para bolos e em sucos de frutas, além de outras aplicações), têxtil, farmacêuticas, cosméticos, etc (Müller et al, 2011). Possuem também outras aplicações, como em imobilização de células, na engenharia de tecidos, microencapsulação de nutracêuticos e drogas (Sellimi et al., 2015), podendo ser útil também na prevenção da obesidade, hipercolesterolemia e diabetes (Wang e He, 2010).

Os alginatos, proveniente de algas pardas, podem ser encontrados em espécies como: *Macrocystis pyrifera* (Gomez et al., 2009; McHugh et al., 2001), *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japônica*, *Ecklonia radiata* (Lorbeer et al., 2015) e *Sargassum sp* (Andriamanantoanina et al., 2010), *Sargassum cymosum* (Mafra Jr e Cunha, 2002), *Sargassum vulgare* (Torres et al, 2007), *Sargassum fusiforme* (Cong et al, 2014) e *Sargassum filipendula* (Bertagnolli et al, 2014). No litoral das regiões sul e sudeste do Brasil, o gênero *Sargassum* é mais comumente encontrado e possui uma relevante aplicabilidade como fonte de alginato (Mafra Jr e Cunha, 2002).

Compostos com atividade antioxidante possuem atrativos consideráveis para sua aplicação na preservação de alimentos e também para a saúde humana (Shahidi e Zhong, 2010). Estudos têm sido realizados avaliando a atividade antioxidante de soluções de alginato. Kelishomi et al. (2015) avaliaram a atividade antioxidante de alginato e observaram dependência das propriedades antioxidantes ao tratamento de despolimerização. Xue et al. (1998) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes polissacarídeos hidrossolúveis e verificaram que estes exercem papel importante no mecanismo dos sistemas biológicos.

Para a indústria alimentícia o estudo das propriedades reológicas tem um papel essencial para dimensionamentos de equipamentos, nas análises em processos que possuem escoamento de produtos, como por exemplo, pasteurização, evaporação, processamento asséptico, entre outros. São empregados em cálculos de processo que envolve escoamento de fluido (bombeamento, extração, filtração, extrusão, purificação) (Marcotte et al., 2001).

As propriedades reológicas de alginatos são fortemente influenciadas pela composição de ácidos urônicos, que é diretamente dependente da época e das condições ecológicas de crescimento de algas (Rinaudo et al., 2008), assim como rendimento (Bertagnolli et al., 2014) e massa molecular do polímero (Rahelivao et al., 2013; Fertah et al., 2013). Bertagnolli et al. (2014) estudaram a variação das estações do ano sobre o rendimento e estrutura do alginato extraído de *Sargassum filipendula* e observaram que as algas coletadas durante a primavera oferecem ao alginato maiores rendimentos e géis mais resistentes. Portanto, o estudo de alginato extraído de algas coletadas em diferentes posições geográficas é interessante para estimular a produção de alginato de sódio proveniente do litoral de São Paulo, bem como o conhecimento de suas características reológicas e bioquímicas.

O presente trabalho teve como objetivo comparar alginatos de sódio extraídos de algas *Sargassum cymosum* C. Agardh, coletadas em diferentes localidades, em relação ao rendimento, massa molecular, propriedades reológicas e capacidade antioxidante.

2.0. METODOLOGIA

2.1. Processamento e secagem das macroalgas

As algas estudadas foram coletadas do litoral do Estado de São Paulo, na Praia Grande em Ubatuba (23°28'00"S – 45°03'36"W) no mês de outubro de 2016, e no litoral de São Sebastião na praia das Cigarras (23°43'42"S – 45°23'51"W), em março de 2015. O material coletado foi acondicionado em frascos com água do mar e transportado sob baixa temperatura. Primeiramente foi feita a triagem das algas em água corrente, separando-as de quaisquer organismos exógenos a elas. Após limpeza prévia, estas foram sanitizadas com água clorada (25 ppm) durante 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado, em centrífuga doméstica, 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 fechadas e mantidas à temperatura ambiente.

2.2. Extração de alginato de sódio

Foram realizadas extrações em duas algas *Sargassum cymosum* C. *Agardh* coletadas em localidades diferentes, Ubatuba (ASU) e São Sebastião (ASS), ambos situados no litoral de São Paulo. As extrações foram efetuadas em 15 processos diferentes, sendo 3 repetições de um ponto central, para cada alga totalizando 30 extrações. O processo foi realizado através da metodologia modificada de McHugh et al. (2001) e com os parâmetros otimizados por Lorbeer et al. (2015), na etapa de tratamento ácido. Para cada tratamento, 6 g de alga em pó foram imersas em etanol e agitada em shaker por 3 horas. Esse procedimento foi repetido duas vezes, possibilitando a retirada dos compostos fenólicos e proteínas. Posteriormente, a alga foi seca *overnight* em estufa a 40°C e, o produto seco, submetido ao tratamento ácido, que consistiu na adição de água destilada e adição de ácido clorídrico 0,1 M, até pH 2,0, a 45 °C por 110 minutos, sob agitação em shaker a 250 rpm. As amostras foram lavadas com água destilada e, nestas, foi realizada a otimização das condições de extração. Primeiramente, foi adicionado carbonato de sódio 10%, até atingir o pH desejado (pH 8, 9 e 10), por tempos (90, 195 e 300 minutos), nas temperaturas de 50, 65 e 80 °C, sob agitação. A solução foi filtrada repetidamente até a retirada das impurezas. Para a separação do alginato de sódio, foi adicionado à solução, etanol (1:2, v/v), precipitando o produto desejado, que foi separado por centrifugação (3000 rpm) e seco em estufa a 45 °C por 15 horas, para a obtenção do alginato de sódio.

O rendimento do alginato de sódio foi calculado seguindo a Equação 1, sendo a umidade do material determinada, em triplicata, em estufa a 105°C até peso constante.

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

2.3. Determinação da viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca de soluções de alginato foi determinada utilizando viscosímetro capilar Cannon-Fensk, mantido em banho termostático a 25 °C. Soluções do polissacarídeo foram preparadas nas concentrações de 2,0 – 10,0 g/L (Martinsen, Skjak-Braek e Smidsrod, 1991), tendo como solvente solução de NaCl 0,1 M (Martinsen, Skjak-Braek e Smidsrod, 1991; Mancini et al, 1996). A viscosidade intrínseca do polissacarídeo foi determinada usando a expressão empírica de Huggins (Equação 2). O valor da viscosidade intrínseca foi avaliado pela extrapolação da reta obtida à concentração zero, pois segundo a teoria de Huggins, a baixas concentrações, conforme a relação:

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

Equação 2

onde K_H é o coeficiente de Huggins ou coeficiente de interação, η_{sp} é a viscosidade específica e η_{sp}/c é a viscosidade reduzida (Torres et al., 2007). O cálculo da massa molecular do polímero foi determinado a partir da equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 3)

$$[\eta] = kM_v^\alpha$$

Equação 3

Onde η é a viscosidade intrínseca (dL/g), M_v é a massa molecular viscosimétrica média (Dalton) e k e α são constantes viscosimétricas que dependem da natureza do solvente, da temperatura e da estrutura química do polímero. Clementti et al. (1998) propôs uma equação empírica para determinação de massa molecular de alginato, onde K é 0,023 e α é 0,984. Esta equação também foi utilizada para determinação da massa molecular de algas

marrons dos gêneros *Sargassum vulgare* (Torres et al., 2007) e *Laminaria digitata* (Fertah et al., 2014).

2.4. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das soluções 1% (m/v) de alginato de sódio, de duas extrações selecionadas, para cada alga coletada, foram avaliada pelo ensaio ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), segundo Ré et al. (1999). O radical ABTS foi preparado a partir da reação de solução de ABTS (concentração final 7 mM) com uma solução de persulfato de potássio (concentração final de 140 mM; Sigma-Aldrich). Esta mistura foi mantida no escuro, a temperatura ambiente, durante 16 horas. Após este tempo, a absorbância foi corrigida para 0,7 ($\pm 0,05$) medido a 734 nm. Cinco diluições, em triplicata, das soluções de alginato ou padrão Trolox (100-2000 μM) foram transferidas para tubos de ensaio e misturadas com o radical ABTS. A leitura de absorbância foi realizada a 734 nm após 6 minutos de reação. Os resultados são expressos como μM equivalente Trolox (TE) por g de matéria seca

2.5. Caracterização reológica do polissacarídeo

A caracterização reológica foi realizada em reômetro rotacional AR2000 (TA Instruments, New Castle/EUA), com geometria de cilindros concêntricos. Soluções de alginato foram preparada na concentração de 1% (m/v). Curvas de fluxo, as quais relacionam a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, foram determinadas a 25 °C no intervalo de 0 a 300 s^{-1} em estado estacionário, para a obtenção do comportamento e das propriedades reológicas do material. O modelo reológico Ostwald-de-Waele (Equação 4) foi ajustado aos dados experimentais, obtidos para todas as amostras, com o auxílio do software Origin.

$$\tau = k\dot{\gamma}^n$$

Equação 4

Onde k é o índice de consistência (Pa s^n), n é o índice do comportamento de escoamento do fluido, τ é a tensão de cisalhamento (Pa) e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}). Os parâmetros K e n são obtidos por regressão não linear (Torres et al., 2007). Foi realizada a análise dos parâmetros estatísticos de qui-quadrado, soma dos quadrados dos resíduos e coeficiente de correlação.

2.6. Ressonância magnética nuclear (NMR)

Foram realizadas análises de algumas amostras de alginato de sódio e selecionada a amostra que obteve um espectro com picos mais definidos, para a verificação da estrutura química do alginato de sódio. As análises de espectros de ^1H NMR foram obtidas usando o espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear a 400 MHz Bruker DRX Avance. As amostras (40 mg) foram solubilizadas em D_2O (óxido de deutério) e analisadas a 50 °C.

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimento e massa molecular dos alginatos extraídos

Os dados obtidos de rendimento e massa molecular dos alginatos extraídos da alga *Sargassum cymosum* C.Agardh proveniente de Ubatuba (ASU) e São Sebastião (ASS), estado de São Paulo, são apresentados na Tabela 1. Pode-se observar (Figura 1) que as duas algas obtiveram diferentes valores de rendimento e massa molecular. Os alginatos de ASU apresentaram maiores massa moleculares, porém menores rendimentos quando extraído a pH menores. Enquanto que, para ASS, o rendimento foi maior na maioria das extrações e a massa molecular foi bem menor que ao ASU. Bertagnolli et al. (2014) estudaram alginato de *Sargassum filipendula*, coletados em Cigarras, no litoral do Estado de São Paulo, em diferentes estações do ano, e obtiveram que no inverno e, principalmente, na primavera o rendimento foi maior (17%) do que

no verão (15%). Resultados contrários foram verificados no presente trabalho, já que as algas ASU foram coletadas na primavera e, no entanto, apresentaram menor rendimento, na maioria das extrações, do que os alginatos ASS, coletados no verão. Assim, além da estação do ano, as condições ambientais das coletas também influenciam no rendimento e composição da alga.

Tabela 1- Valores de Rendimento e Massa Molecular dos alginatos de sódio extraídos de *Sargassum cymosum* C.Agardh em diferentes localidades

Extração	Tempo (min)	Temperatura (°C)	pH	ASU		ASS	
				Rendimento (%)	Massa molecular (kDa)	Rendimento (%)	Massa molecular (kDa)
1	300	80	9	9,22	127,21	25,36	20,12
2	90	80	9	7,7	199,74	23,2	30,48
3	195	80	10	51,84	114,19	35,15	28,07
4	195	65	9	9,83	121,92	17,71	29,03
5	90	50	9	4,42	161,09	20,92	17,94
6	195	65	9	8,65	117,64	24,16	34,4
7	195	50	8	5,51	118,07	18,1	28,11
8	90	65	8	5,79	77,86	12,08	32,57
9	300	50	9	6,15	159,68	21,3	14,53
10	195	80	8	8,3	138,23	20,64	3,85
11	300	65	10	40,7	139,82	45,58	22,71
12	90	65	10	37,38	233,31	42,75	22,43
13	195	65	9	6,81	105,22	20,26	31,56
14	300	65	8	7,11	148,92	26,39	36,94
15	195	50	10	32,61	203,21	41,12	37,94

Segundo Lapasin e Pricl (1999), a estrutura do alginato é muito influenciada pelo habitat que a alga foi coletada e pelo estresse ambiental que esta sofreu. A alga ASU, coletada na região costeira de Ubatuba (SP), devido ao ambiente em que esta espécie se encontrava, área de batimento de onda, estava mais expostas aos fatores ambientais, possibilitando maior estresse marítimo e climático sobre a alga, conferindo a ela maior massa molecular. Já para a alga que foi coletada em São Sebastião, próxima ao porto marítimo, onde há presença de navios costeiros, que contribuem para o aumento da poluição da água, esse fator ambiental pode ter contribuído para a redução da qualidade do polissacarídeo. Andriatamanantoanina e Rinaudo (2010) avaliaram *Sargassum*

sp. coletadas em diferentes locais de Madagascar e observaram pequena diferença entre os rendimentos (23,6% e 26,6%), porém a massa molecular (385 kDa e 190 kDa) foi maior em uma das algas.

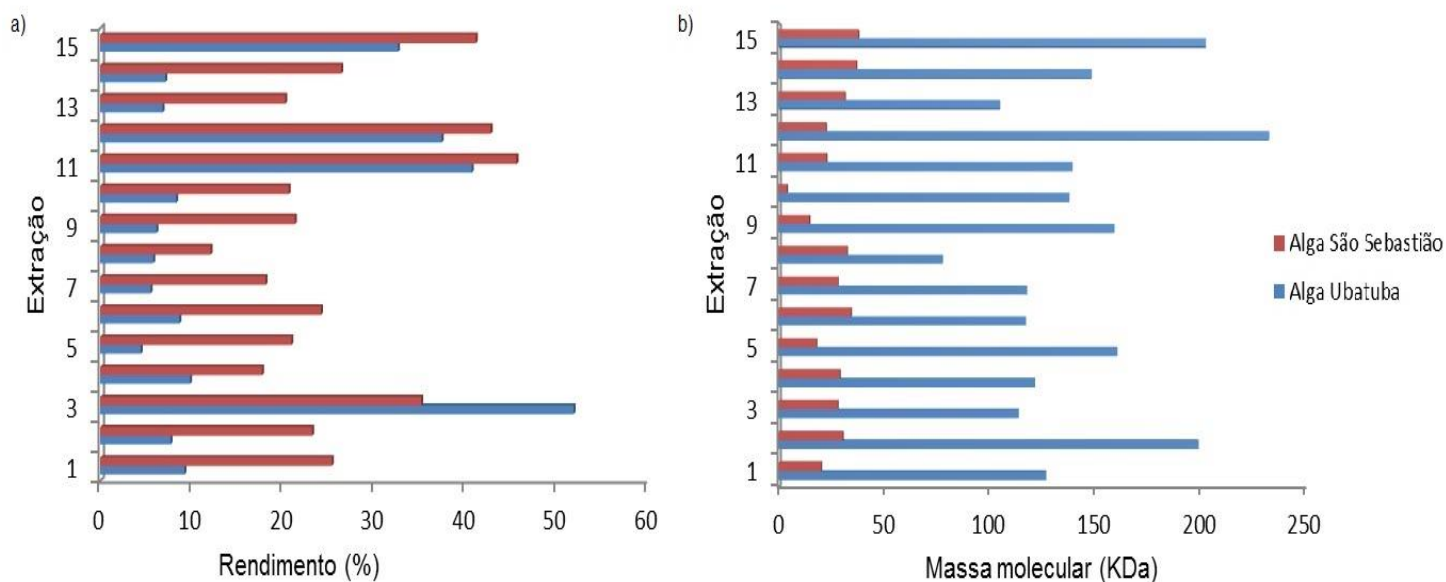


Figura 1- Rendimento e massa molecular de alginatos de sódio extraído de algas *Sargassum cymosum* C.Agardh de diferentes localidades em função de diferentes parâmetros de extração (vide Tabela 1).

3.2. Avaliação da atividade antioxidante dos alginatos extraídos

Com a finalidade de avaliar a influência da posição geográfica sobre a capacidade antioxidante dos alginatos extraídos de ASU e ASS foram selecionadas duas extrações (7 e 15), que são distintas em relação aos valores de pH empregados na extração do polissacarídeo (Tabela 2). Conforme estudos prévios, o pH tem a maior influência, dentre os parâmetros estudados, no rendimento e qualidade do alginato.

Tabela 2- Capacidade antioxidante de alginato extraído de algas coletadas em Ubatuba (ASU) e São Sebastião (ASS),

Extração	Tempo	Temperatura	pH	ASU	ASS
				Capacidade Antioxidante (trolox/g alginato)	
7	195	50	8	38,7	37,06
15	195	50	10	50,45	39,19

A atividade antioxidante apresentou valores maiores na extração 15, em que o pH de extração foi maior. Fawzy et al. (2017) realizaram otimização da extração de alginato de sódio de *Sargassum latifolium* e observaram que o pH de extração possui influência na atividade antioxidante do produto extraído, ou seja, quanto maior o pH maior essa atividade, esse comportamento também é observado na Tabela 2. Entre as algas estudadas pode-se observar diferença na atividade antioxidante, ASU apresentou maiores valores do que ASS, principalmente na extração 15. Kellishomi et al. (2014) concluíram que os alginatos que possuem menores massa molecular apresentaram maior atividade antioxidante, no entanto o estudo foi realizado com apenas uma alga. As amostras da extração de ASU apresentaram maior massa molecular e maior atividade antioxidante do que a amostra ASS, porém o alginato foi extraído de algas coletadas em locais diferentes. Essa relação mostra que as condições ecológicas em que as algas crescem também influenciam na propriedade antioxidante do alginato extraído. O ambiente influencia o desenvolvimento de mecanismos fisiológicos e biomoleculares de defesa contra espécies reativas do oxigênio, por isso são fonte de substâncias antioxidantes (Rinaudo et al.. 2008). A alga ASS estava exposta à poluição, por estar perto de regiões portuárias, o que pode ter interferido a menor atividade antioxidante.

3.3. Estudo do comportamento reológico dos alginatos extraídos

O comportamento reológico das 15 soluções de alginato de sódio (1% m/v) é apresentado nas Figuras 3 e 4. Observa-se que na Figura 3, que

apresenta amostras de alginato ASU, que para uma certa taxa de cisalhamento, diferentes valores de tensão de cisalhamento são obtidos, ou seja, a viscosidade é reduzida com o aumento da deformação. Segundo Ibarz e Barbosa Canovas (1999), tal característica, ou seja, a não proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento é particular de um comportamento não-newtoniano. Tais características de fluido não newtoniano também foram obtidos por Ma et al. (2014) que realizaram avaliação reológica de alginato de sódio. Para as amostras ASS (Figura 4) a proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento é maior, ou seja, a curva se aproxima de um comportamento de fluido Newtoniano, essa característica do alginato de sódio ASS a baixa massa molecular, consequência do ambiente em que a alga estava exposta durante seu crescimento, que era um habitat poluído por ser uma região portuária. Torres et al. (2007) também obtiveram comportamento newtoniano em solução de 0,5% de alginato de alta viscosidade extraído de algas marrons.

Para descrever o comportamento reológico dos alginatos de sódio ASS e ASU foi utilizado o modelo da Lei da Potência (Tabela 3), que proporcionou bons parâmetros estatísticos para ajuste dos dados experimentais, apresentando altos valores de R^2 e baixos valores de χ^2 . Todos as amostras avaliadas apresentaram valores de coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,9 e de qui-quadrado (χ^2) muito menores do que 2,84. De acordo com os valores de n , as amostras ASU exibiram comportamento de pseudoplástico ($n < 1$), sendo a extração 15 apresentou valor n igual 0,67 e K igual a 171,69 $\text{mPa}\cdot\text{s}^n$. Enquanto que as amostras de ASS os valores de n foram muito próximos de 1, ou seja, semelhante a um fluido Newtoniano, algumas extrações (2, 5, 8 e 14) obtiveram valores de n iguais a 0,95 e K próximos a 2 $\text{mPa}\cdot\text{s}^n$.

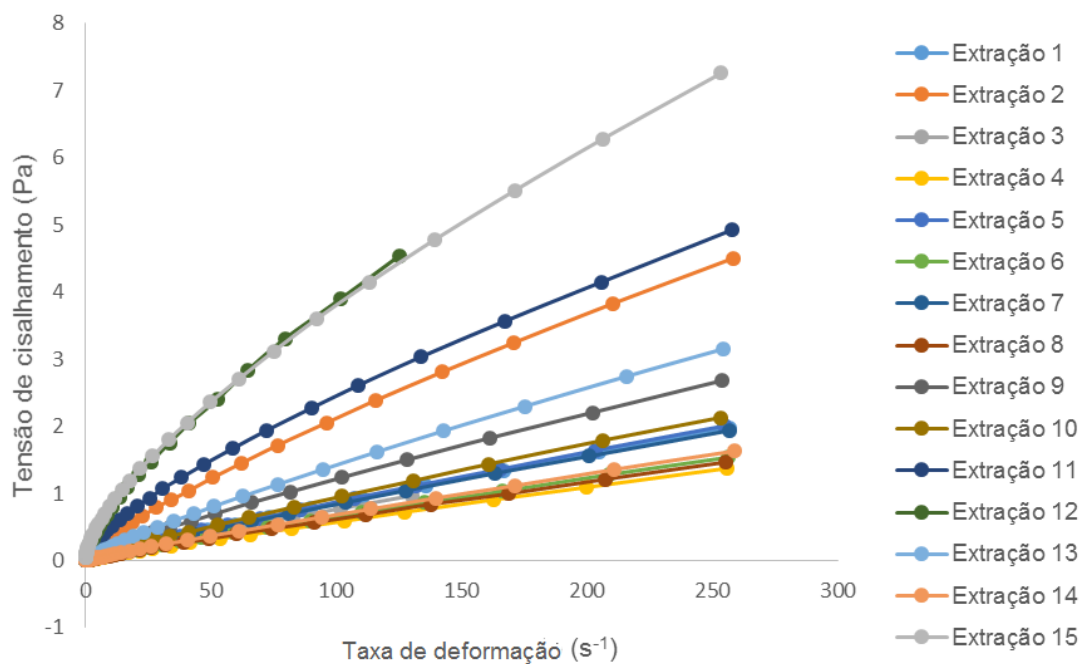


Figura 3- Reograma do alginato de sódio ASU (condição de extração vide Tabela 1).

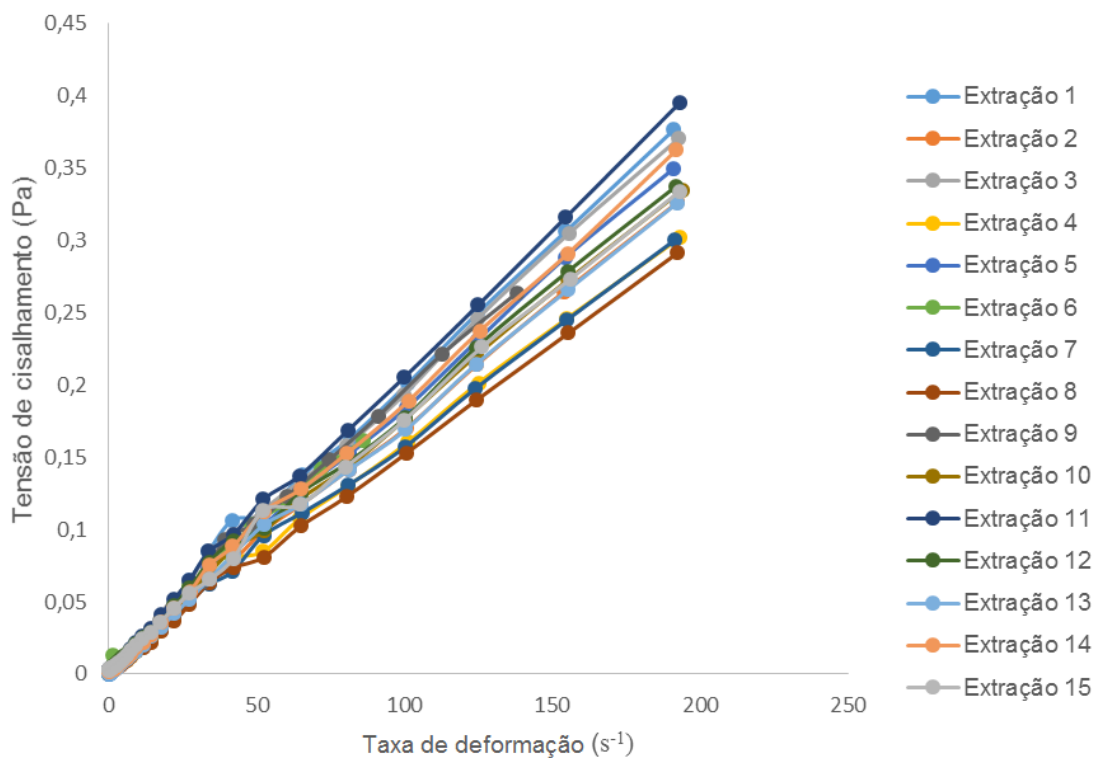


Figura 4- Reograma dos alginatos de sódios ASS (idem Figura anterior).

Tabela 3- Parâmetros reológicos do modelo da Lei da potência pa os alginatos de sódio ASS e ASU em função dos diferentes parâmetros de extração (Vide Tabela 1).

Extração	ASS					ASU				
	Índice de consistência K (mPa.s ⁿ)	Índice de comportamento de escoamento do fluido (n)	χ^2	SSR	R ²	Índice de consistência K (mPa.s ⁿ)	Índice de comportamento de escoamento do fluido (n)	χ^2	SSR	R ²
1	2,83	0,93	0,000015	0,0005	0,99831	14,45	0,89	0,000012	0,0005	0,99994
2	2,2	0,95	0,000003	0,0001	0,99955	55,16	0,79	0,000019	0,0008	0,99998
3	2,92	0,92	0,000105	0,0003	0,9988	13,14	0,88	0,000002	0,0001	0,99995
4	2,18	0,94	0,000006	0,0002	0,99894	8,34	0,92	0,000008	0,0004	0,99991
5	2,43	0,95	0,000004	0,0001	0,99994	14,9	0,88	0,000009	0,0004	0,99996
6	2,49	0,94	0,000008	0,0002	0,99563	10,9	0,89	0,000011	0,0005	0,99992
7	2,24	0,93	0,000005	0,0001	0,99913	14,69	0,88	0,000009	0,0004	0,99995
8	1,97	0,95	0,000006	0,0002	0,99888	9,41	0,91	0,000009	0,0004	0,99992
9	2,65	0,93	0,000006	0,0002	0,9987	25,88	0,84	0,000024	0,001	0,99994
10	2,6	0,92	0,000004	0,0001	0,99939	16,38	0,88	0,000002	0,0009	0,99992
11	2,83	0,94	0,000008	0,0003	0,9991	92,49	0,71	0,000319	0,014	0,99978
12	2,84	0,91	0,000009	0,0003	0,99866	150,32	0,7	0,000283	0,0125	0,99977
13	2,27	0,94	0,000006	0,0002	0,99914	28,83	0,85	0,000017	0,0005	0,99998
14	2,42	0,95	0,000008	0,0002	0,99901	10,62	0,91	0,000013	0,0005	0,99991
15	2,62	0,92	0,000001	0,0003	0,99857	171,69	0,67	0,00126	0,0553	0,99962

SSR- Soma dos quadrados dos resíduos

3.4. Análise de ressonância magnética

A análise de ressonância magnética foi realizada para confirmar a extração de alginato de sódio, observando a sua estrutura característica em espectros de RMN (Figura 5).

Segundo Gomez et al. (2009), os sinais obtidos em espectros de alginato de sódio estão em 5, 4.6 e 4.37 ppm, que correspondem respectivamente ao próton anomérico do ácido gulucurônico: H1-G (pico 1), ao ácido gulucurônico: H1-M + GM (pico 2) e ao próton anomérico do ácido manurônico: H5-GG (pico 3). Valores próximos ao estudo anterior foi obtido por Torres et al. (2007), sendo que em H1-G foi obtido em 5.06 ppm, H1-M + GM em 4.7 e H5-GG em 4.4 ppm. No presente estudo os picos foram encontrados em 4.97 ppm (pico 1 / H1-G), 4.57 ppm (pico 2 / H1-M + GM) e 4.37 ppm (pico 3 / H5-GG), apresentando um espectro característico de alginato de sódio.

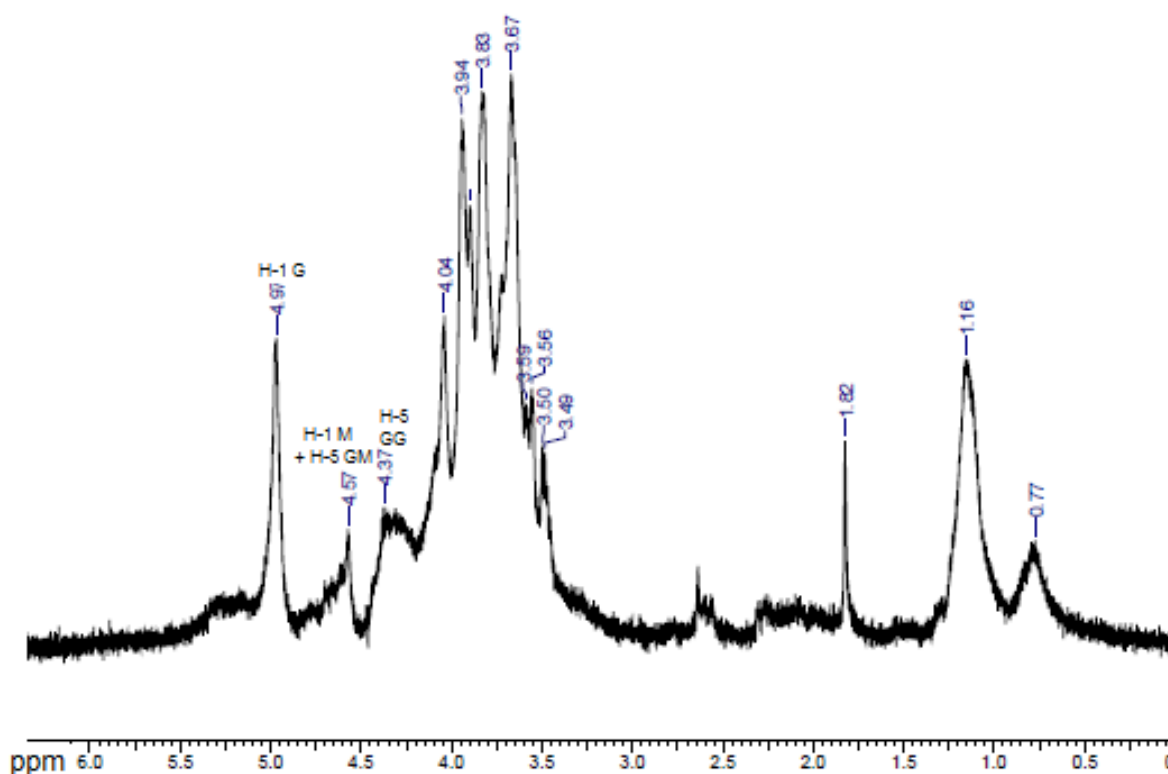


Figura 5- Espectro de ^1H NMR do alginato de sódio da extração 4.

4.0. CONCLUSÃO

A avaliação do alginato extraído de *Sargassum cymosum* C.Agardh de locais diferentes apresentou resultados relevantes. O rendimento de alginato extraído apresentou diferença entre as algas coletadas em regiões diferentes. A ASS apresentou maior rendimento do que a ASU, porém com menor massa molecular do que a ASU. A atividade antioxidante apresentou maior valor para a ASU. A menor capacidade antioxidante de ASS pode ser devido a poluição em que a alga estava exposta durante seu crescimento. As amostras ASU apresentaram características de fluido Newtoniano e, enquanto que os alginatos ASU, fluido pseudoplástico. A análise de RMN apresentou um espectro característico de alginato de sódio, comprovando a eficácia das extrações.

5.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIAMANANTOANINA, H., RINAUDO, M. **Characterization of the alginates from five madagascan brown algae**. Carbohydrate Polymers, v. 82, p. 555–560, 2010.

BERTAGNOLLI, C.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M.; KLEINÜBING, S. J.; TASIC, L.; DA SILVA, M. G. C. **Sargassum filipendula alginate from Brazil: seasonal influence and characteristics**. Carbohydrate Polymers, v. 111, p. 619-623, 2014.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à Química dos alimentos**, São Paulo, Varela, 2003.

COHEN, Z., VONSHAK, A. **Fatty acid composition of Spirulina and Spirulina-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy**. Phytochemistry, v. 30, p. 205–206, 1991.

CLEMENTI, F.; MANCINI, M.; MORESI, M. **Rheology of alginate from Azotobacter vinelandii in aqueous dispersions**. Journal Food Engineering. v. 36, p. 51-62, 1998.

CONG, Q.; XIAO, F.; LIAO, W.; DONG, Q.; DING, K. **Structure and biological activities of na alginate from Sargassum fusiforme, and its sulfated derivative**. International Journal of Biological Macromolecules. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.056>, 2014.

DAMORADAN, S.; PARKIN, K. L. FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed, p. 95-130, 2010.

DRAGET, K. I.; SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. **Alginates**. In: **Steinbuchel A, Rhee SK (eds) Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry: Properties, Production, and Patents**. Wiley. Winheim, p. 1-30, 2005.

FAWZY, M. A.; GOMAA, M.; HIFNEY, A. F.; ABDEL-GAWAD, K. M. **Optimization of alginate alkaline extraction technology from *Sargassum latifolium* and its potential antioxidant and emulsifying properties**. Carbohydrate polymers, v. 157, p. 1903-1912, 2017.

FERTAH, M.; BELFKIRA, A.; DAHMANE, E.; TAOURIRTE, M.; BROUILLETTE, F. **Extraction and characterization of sodium alginates from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed**. Arabian Journal of Chemistry, v. 10, p. 1-10, 2013.

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

IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos**. Technomic. Pennsylvania – USA. v. 85, p. 85-204, 1996.

KELISHOMI, Z.H.; GOLIAEI, B.; MAHDAVI, H.; NIKOOFAR, A.; RAHIMI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; MAMASHLI, F.; BIGDELI, B. **Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment**. Food Chemistry, v.196, p.897–902, 2015.

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications**. Blackie academic e professional, 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.

MA, L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Rheological properties of food gums and food gum mixtures**. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment., v. 33, n.2, p.133-163, 1993.

MA, J; LIN, Y.; CHEN, X.; ZHAO, B.; ZHANG, J. **Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions**. Food Hydrocolloids. v. 38, p. 119-128, 2014.

MAFRA JR, L. L.; CUNHA, S. R. **Bancos de *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae) na enseada de armação do Itapocoroy, Penha, SC: Biomassa e rendimento em alginato**. Notas Técnicas Facimar, v. 6, p. 111-119, 2002.

MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. **Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates**. Journal of food Engineering, v. 28, p. 283-295, 1996.

MARCOTTE, M.; TAHERIAN, A. R.; RAMASWAMY, H. S. **Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature**. Food Research International, v.34, n.8, p. 695-703, 2001.

MARTINSEN, A.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O. **Comparasion of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates**. Carbohydrate Polymers, v. 15, p. 171-193, 1991.

McHUGH, D. J.; HERNANDEZ-CARMONA, G.; ARVIZU-HIGUERA, D. L.; RODRIQUEZ-MONTESINOS, Y. E. **Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*: Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid**. Journal of Applied Phycology, v. 13, p. 471–479, 2001.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. **Produção de alginato por microrganismos**. Polímeros, v. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.

RAHELIVAO, M. P.; ANDRIAMANANTOANINA, H.; HEYRAUD, A.; RINAUDO, M. **Structure and properties of three alginates from Madagascar seacoast algae**. Food Hydrocolloids, v.32, p.143-146, 2013.

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

RE, R.; PELLEGRINI, N; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, ,.; RICE-EVANS, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay**. Free Radical Biology and Medicine, v.26, p. 1231–1237, 1999.

RINAUDO, M. **Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials**. Polymer International, 57, 397–430, 2008.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. **Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante**. Revista Brasileira de Farmagnosia, v. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.

ROSS, A.B.; JONES, J.M.; KUBACKI, M.L.; BRIDGEMAN, T., (2008). **Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour**. Bioresoure Technology, v. 99, p. 6494–6504, 2008.

SCHENKMAN, R. P. F. **Hypnea musciformis (rhodophyta): ecological influence on growth**. Journal of Phycology, v. 25 (1), p. 192–196, 1989.

SELLIMI, S.; YOUNES, I.; AYED, H. B.; MAALEJ, H.; MONTERO, V.; RINAUDO, M.; DAHIA, M.; MECHICH, T.; HAJJI, M.; NASRI, M. **Structural, physicochemical and antioxidante properties of sodium alginate isolated**

from a Tunisian brown seaweed. International Journal of Biological Macromolecules, v. 72, p. 1358-1367, 2015.

SHAHIDI, F.; JANAK KAMIL, Y. **Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry.** Trends in Food Science and Technology, v. 12, p. 435-464, 2001

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. **Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion.** Lipids Science. v. 112, p. 930–940, 2010.

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.

WANG, T.; HE, N. **Preparation, characterization and applications of low-molecular-weight alginate-oligochitosan nanocapsules.** Nanoscale, v. 2, p. 230–239, 2010.

XUE, C. H.; YU, G. L.; HIRATA, T.; TERAOKA, J.; LIN, H. (1998). **Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 62, p. 206–209, 1998.