

UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ASSIS - SP

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

**NATALIE STEPHANIE SAWADA NUNES**

**Extração de fucoidano a partir de Extração Assistida por Ultrassom e ácido  
cítrico de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh:  
Caracterização química e estrutural com aplicação na produção de hidrogéis  
visando impressão 3D**

**NATALIE STEPHANIE SAWADA NUNES**

**Extração de fucoidano a partir de Extração Assistida por Ultrassom e ácido cítrico de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh:  
Caracterização química e estrutural com aplicação na produção de hidrogéis visando impressão 3D**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, como requisito à obtenção de título de Doutora em Biociências (Área de Conhecimento: Aplicação e Caracterização da Diversidade Biológica)

Orientador (a): Dra. Ivanise Guilherme Branco

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

**ASSIS  
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ana Cláudia Inocente Garcia - CRB 8/6887

N972e Nunes, Natalie Stephanie Sawada  
Extração de fucoidano a partir de extração assistida por ultrassom e ácido cítrico de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh : caracterização química e estrutural com aplicação na produção de hidrogéis visando impressão 3D / Natalie Stephanie Sawada Nunes. — Assis, 2024  
91 f. : il.

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

1. Impressão 3D. 2. Algas pardas. 3. Polissacarídeos.  
I. Título.

CDD 579.8



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE NATALIE STEPHANIE SAWADA NUNES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS - CÂMPUS DE ASSIS.**

Aos 08 dias do mês de abril do ano de 2024, às 13:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de NATALIE STEPHANIE SAWADA NUNES, intitulada **Extração de fucoídano a partir de Extração Assistida por Ultrassom e ácido cítrico de algas pardas Sargassum cymosum C. Agardh: Caracterização química e estrutural com aplicação na produção de hidrogéis visando impressão 3D**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. IVANISE GUILHERME BRANCO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/FCL - Assis/SP, Profa. Dra. CASSIA ROBERTA MALACRIDA MAYER (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biotecnologia / UNESP/FCL - Assis/SP, Profa. Dra. CYNTHIA DITCHFIELD (Participação Virtual) do(a) USP/FZEA - Pirassununga/SP, Profa. Dra. IZABEL CRISTINA FREITAS MORAES (Participação Virtual) do(a) USP/FZEA - Pirassununga/SP, Profa. Dra. GRASIELE SCARAMAL MADRONA (Participação Virtual) do(a) UEM - Maringá/PR. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. IVANISE GUILHERME BRANCO

## **AGRADECIMENTOS**

À orientadora deste trabalho, Dra. Ivanise Guilherme Branco, pela orientação, dedicação e paciência durante todo o processo de elaboração desta pesquisa.

À Dra. Cássia Roberta Malacrida Mayer, pela disposição de empréstimo de equipamentos e também pelo conhecimento transmitido durante todos esses anos.

À minha família, pelo apoio durante todos esses anos de estudos dentro da universidade.

À minha amada Ana Carolina Valladares dos Santos, pelo apoio durante o final do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Andreana, Luana, Luigi, Kim, Iara e Flávia pelas gameplays e risadas.

À minha amiga Jacqueline, por todos esses anos de apoio, paciência e amizade.

À Beatriz que conheci por pouco tempo, mas me apoiou durante o final deste processo.

Aos companheiros de laboratório Arthur, Camila, João Marcos e Mariana pelo convívio diário e presença durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos membros da banca de qualificação e defesa.

Aos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR): Laboratórios Multiusuário do Câmpus Londrina (LabMult-LD) Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais – CMCM da UTFPR-CT, pelas análises realizadas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram de alguma forma.

*“O inverno nunca falha em se tornar primavera”*

Nichiren Daisonin

NUNES, Natalie Stephanie Sawada. **Extração de fucoidano a partir de Extração Assistida por Ultrassom e ácido cítrico de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh: Caracterização química e estrutural com aplicação na produção de hidrogéis visando impressão 3D.** 2024. 91f. Tese (Doutorado Acadêmico em Biociências – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2024.

## RESUMO

O fucoidano é um heteropolissacarídeo sulfatado prevalente em algas pardas, que exibe atividade biológica e antioxidante. A primeira etapa do estudo otimizou as condições de extração assistida por ultrassom (EAU), utilizando o delineamento experimental Box-Behnken (BBD), a fim de maximizar o rendimento do fucoidano extraído da alga *Sargassum cymosum* C. Agardh. Foi avaliada a influência da razão solvente/biomassa, tempo e potência ultrassônica sobre o rendimento de fucoidano. Os resultados mostraram que a potência ultrassônica exerceu o maior efeito no aumento do rendimento ( $17,12\% \pm 0,24$ ). A caracterização do material obtido foi por análises químicas (sulfato, fucose, carboidratos, proteína e polifenóis) e estruturais (composição de monossacarídeos, espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR) ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$  NMR) e massa molecular). A atividade antioxidante foi investigada através dos ensaios FRAP, ABTS e DPPH. O fucoidano extraído na condição otimizada exibiu baixa massa molecular (8 kDa) e, em sua estrutura, presença de fucose, sulfato e outros monossacarídeos, confirmado pelos espectros MIR-ATR e  $^1\text{H}$  NMR. O material extraído apresentou atividade antioxidante para o ensaio com ABTS ( $22,1 \pm 0,005 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) e baixa atividade antioxidante para FRAP ( $0,86 \pm 0,004 \text{ mg TE g}^{-1}$ ) e DPPH ( $3,4 \text{ mmol TE} / 100 \text{ g}^{-1}$ ). A partir dos resultados obtidos conclui-se que a otimização do rendimento foi eficiente. Na segunda etapa, hidrogéis foram formulados contendo o fucoidano (FU) extraído da alga parda, ágar (AG) e alginato de sódio (SA) comerciais, através da gelificação térmica visando impressão 3D. Foram elaboradas três formulações, com as seguintes concentrações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA. A caracterização das matrizes poliméricas foi através de análises físicas (potencial zeta, diâmetro da partícula, índice de polidispersão (PDI)), química (pH) e estruturais (reologia, MIR-ATR e MEV). Além disso, foram caracterizadas por aparência visual, printabilidade

(precisão de deposição (DA) e taxa de espalhamento (SR)) e textura. A formulação 1%FU 2%AG 2%SA se destacou pelos bons resultados de potencial zeta ( $-25.5 \pm 2.47$  mV), diâmetro da partícula ( $3,703 \pm 22.62$   $\mu\text{m}$ ) e PDI ( $0.483 \pm 0.11$ ). As análises reológicas das formulações revelaram comportamento pseudoplástico ( $n < 1$ ), com diferenças nas temperaturas de gelificação. A melhor taxa de recuperação (79,6%) foi obtida pela formulação 1%FU 2%AG 2%SA. A varredura de amplitude evidenciou maior força do gel com 3% de ágar e a varredura de frequência demonstrou a estabilidade das formulações. O MIR-ATR evidenciou melhores interações repulsivas entre cadeias carboxilas, sulfato e radical hidroxila dos polissacarídeos, na formulação 1%FU 2%AG 2%SA. A microscopia das formulações mostrou aspecto morfológico no formato de lâminas com maior formação de poros nas maiores concentrações de ágar ou alginato de sódio. A melhor printabilidade foi alcançada pela formulação 1%FU 2%AG e 2%SA (DA e SR próximos de 1), com diâmetro de agulha de 1,2 mm e 10 mm/s de velocidade de impressão. Os cubos impressos com parâmetros citados acima exibiram ótima precisão de impressão ( $99,66\% \pm 0,05$ ), estabilidade estrutural após 1 hora de impressão ( $99\% \pm 0,05$ ) e textura macia. Em síntese, este estudo apresenta a caracterização e aplicação do fucoidano, extraído da espécie *Sargassum*, na impressão 3D. Essa inovação abre novas possibilidades para a utilização do fucoidano nos setores alimentício, nutricional, biomédico, entre outros.

**Palavras-chave:** fucoidano; algas pardas; matrizes poliméricas; printabilidade.

NUNES, Natalie Stephanie Sawada. **Fucoidan extraction by Ultrasound Assisted Extraction and citric acid from brown algae *Sargassum cymosum* C. Agardh: Chemical and structural characterization with application in hydrogels production for 3D printing.** 2024. 91f. Thesis (PhD in Biosciences – (UNESP), São Paulo State University (UNESP), School of Sciences and Languages, Assis, 2024.

#### ABSTRACT

Fucoidan is a sulfated heteropolysaccharide predominant in brown algae, which has biological and antioxidant activity. The first stage of the study optimized the conditions of ultrasound-assisted extraction (UAE), using the Box-Behnken experimental design (BBD), in order to maximize the yield of fucoidan extracted from the alga *Sargassum cymosum* C. Agardh. The influence of the solvent/biomass ratio, time and ultrasonic power on the fucoidan yield was evaluated. The results demonstrated that ultrasonic power had the greatest effect on increasing yield ( $17.12\% \pm 0.24$ ). Characterization of the material obtained by chemical (sulfate, fucose, carbohydrates, proteins and polyphenols) and structural analyzes (composition of monosaccharides, Attenuated Total Reflectance Mid-Infrared Spectroscopy (MIR-ATR), nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR) and molecular weight). The antioxidant activity was investigated using the FRAP, ABTS and DPPH assays. The fucoidan extracted under the optimized condition exhibited a low molecular weight (8 kDa) and, in its structure, the presence of fucose, sulfate and other monosaccharides, confirmed by MIR-ATR and  $^1\text{H}$  NMR spectra. The extracted material showed antioxidant activity for the ABTS assay ( $22.1 \pm 0.005 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) and low antioxidant activity for FRAP ( $0.86 \pm 0.004 \text{ mg TE g}^{-1}$ ) and DPPH ( $3.4 \text{ mmol TE} / 100\text{g}^{-1}$ ). From the results obtained, it can be concluded that the optimization of performance was efficient. In the second stage, hydrogels were formulated containing fucoidan (FU) extracted from brown seaweed, agar (AG) and sodium alginate (SA) commercial, through thermal gelation for 3D printing. Three formulations were prepared, with the following concentrations: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA and 1%FU 3%AG 1%SA. The characterization of the polymer matrices was through physical (zeta potential, particle diameter, polydispersity index (PDI)), chemical (pH) and structural (rheology, MIR-ATR and SEM) analyses. Furthermore, they were evaluated by visual appearance, printability (deposition accuracy (DA) and spreading rate (SR) test and texture. The 1%FU 2%AG 2%SA formulation stood out

for its good results in zeta potential ( $-25.5\pm 2.47$  mV), particle diameter ( $3.703\pm 22.62$   $\mu\text{m}$ ) and PDI ( $0.483\pm 0.11$ ). Rheological analyzes of the formulations revealed pseudoplastic behavior ( $n < 1$ ), with differences in gelation temperatures. The best recovery rate (79.6%) was obtained by the 1%FU 2%AG 2%SA formulation. The amplitude sweep showed greater gel strength with 3% agar and the frequency sweep demonstrated stability of the formulations. MIR-ATR showed better repulsive interactions between carboxyl, sulfate and hydroxyl radical chains of polysaccharides, in the 1%FU 2%AG 2%SA formulation. Microscopy of the formulations showed a morphological appearance in the shape of sheets with greater formation of pores in the highest concentrations of agar or sodium alginate. The best printability was obtained by the 1%FU 2%AG and 2%SA formulation (DA and SR close to 1), with a needle diameter of 1.2 mm and 10 mm/s printing speed. The cubes printed with the parameters mentioned above exhibited excellent printing accuracy ( $99.66\%\pm 0.05$ ), structural stability after 1 hour of printing ( $99\%\pm 0.05$ ) and a soft texture profile. In summary, this study presents the characterization and application of fucoidan, extracted from the *Sargassum* species, in 3D printing. This innovation opens up new possibilities for the use of fucoidan in the food, nutritional, biomedical sectors, among others.

**Keywords:** fucoidan; brown algae; polymeric matrices; printability.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1. Otimização da extração de fucoidano de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh por ultrassom: caracterização química e estrutural

- Figura 1.** Curvas de contorno exibindo a influência da razão solvente/biomassa, tempo de extração e potência ultrassônica no rendimento de fucoidano.....36
- Figura 2.** Espectroscopia no Infravermelho na região média do fucoidano extraído de *Sargassum cymosum* C. Agardh na condição otimizada.....43
- Figura 3.** Espectro  $^1\text{H}$  NMR do fucoidano extraído de *Sargassum cymosum* C. Agardh na condição otimizada, em  $\text{D}_2\text{O}$  e  $60^\circ\text{C}$ .....44

### Capítulo 2. Formulação de matriz polimérica com fucoidano, ágar e alginato de sódio com potencial aplicação em impressão 3D: Caracterização e printabilidade

- Figura 1.** (A) Curvas de fluxo das matrizes poliméricas ajustadas ao modelo da Lei da Potência; (B) Viscosidade em função da taxa de cisalhamento. FU: fucoidano; SA: alginato de sódio; e AG: ágar.....67
- Figura 2.** Rampas de temperatura ( $65\text{-}25^\circ\text{C}$ ) das formulações com 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA a uma taxa de resfriamento de  $1^\circ\text{C min}^{-1}$ .....68
- Figura 3.** Tixotropia das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA.....69
- Figura 4.** Varredura de amplitude das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA.....71
- Figura 5.** Varredura de frequência das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA.....72
- Figura 6.** Espectro MIR-ATR das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA.....73
- Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura das formulações: (A) 1%FU 1%AG 3%SA; (B) 1%FU 2%AG 2%SA and (C) 1%FU 3%AG 1%SA.....74

**Figura 8.** Características visuais e confirmação da gelificação e estabilidade das formulações por meio do método do tubo invertido a temperatura ambiente após a preparação e depois de 24 horas. (A): 1% FU 1%AG 3%SA; (B) 1%FU 2%AG 2%SA e (C) 1%FU 3%AG 1%SA.....75

**Figura 9.** Teste de printabilidade. Filamentos produzidos com 1%FU 2%AG 2%SA com agulha de 1,2 mm e velocidade impressão 10 mm/s.....76

**Figura 10.** Cubo impresso (15x15x15 mm) com formulação a 1%FU 2%AG 2%SA, 1,2 mm de diâmetro da agulha e 10 mm/s após a impressão e 1 hora após.....80

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1. Otimização da extração de fucoídano de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh por ultrassom: caracterização química e estrutural

**Tabela 1.** Delineamento experimental Box-Behnken com variáveis codificadas e reais (X<sub>1</sub>: Razão Solvente/Biomassa; X<sub>2</sub>: Tempo; X<sub>3</sub>: Potência ultrassônica) e resposta (Rendimento de Fucoídano (%)) .....33

**Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático ajustado ao rendimento de fucoídano.....34

### Capítulo 2. Formulação de matriz polimérica com fucoídano, ágar e alginato de sódio com potencial aplicação em impressão 3D: Caracterização e printabilidade

**Tabela 1.** Formulações dos hidrogéis com fucoídano, alginato de sódio e ágar.....60

**Tabela 2.** Características do fucoídano (1%) e formulações de hidrogéis, incluindo tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e pH.....66

**Tabela 3.** Propriedades de escoamento das formulações (Índice de comportamento do fluido ( $n$ ), Índice de consistência ( $k$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ )) .....67

**Tabela 4.** Precisão de deposição e taxa de espalhamento das formulações em diferentes diâmetros de agulha (0.8 mm and 1.2 mm) e velocidade de impressão (2, 10 and 20 mm/s) .....77-78

## LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{H}$ NMR	Análise de ressonância magnética nuclear
3D	Tridimensional
ABTS	ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
AG	Ágar
ANOVA	Análise de variância
BBD	Box-Behnken Design
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de cálcio
DA	Precisão de deposição
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAU	Extração Assistida por Ultrassom
FRAP	Poder Antioxidante redutor férrico
FU	Fuoidano
$G'$	Módulo de armazenamento
$G''$	Módulo de perda
HCL	Ácido Clorídrico
HMWF	Fuoidano de alta massa molecular
HPAEC-PAD	Cromatografia de troca iônica de alto desempenho com detecção pulsada amperométrica
HPSEC-RID	Cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho acoplada com detector de índice de refração
k	Índice de consistência
kDa	Kilodalton
LMWF	Fuoidano de baixa massa molecular
LVE	Região linear viscoelástica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	minutos
MIR-ATR	Espectroscopia no Infravermelho na região média
MMWF	Fuoidano de média massa molecular
mPa.s	Milipascal por segundo

Mw	Massa molecular
$n$	Índice de comportamento do fluido
PDI	Índice de polidispersão
$R^2$	Coefficiente de determinação
$R^2$ adj	Coefficiente de determinação ajustado
rpm	Rotação por minuto
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta
SA	Alginato de sódio
SR	Taxa de espalhamento
$\tan \delta = G''/G'$	Tangente de perda
TPA	Avaliação do perfil de textura
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina) (10 mM em 40 mM HCl)
W	Watts

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2. OBJETIVO GERAL.....	20
2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
Capítulo 1. Otimização da extração de fucoidano de algas pardas <i>Sargassum cymosum</i> C. Agardh por ultrassom: caracterização química e estrutural .....	22
Resumo.....	23
1. Introdução.....	25
2. Material e métodos.....	26
2.1. Material algal.....	27
2.2. Extração do fucoidano.....	27
2.2.1. Pré-tratamento da alga.....	27
2.2.2. Extração do fucoidano.....	27
2.3. Delineamento experimental.....	27
2.4. Características químicas e estruturais do fucoidano.....	28
2.4.1. Composição química.....	28
2.4.2. Análise da massa molecular.....	29
2.4.3. Composição de monossacarídeos.....	29
2.4.4. Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR).....	30
2.4.5. Análise de ressonância magnética nuclear ( <sup>1</sup> H NMR).....	30
2.5. Atividade antioxidante.....	30
2.5.1. Poder Antioxidante redutor férrico (FRAP).....	30
2.5.2. Atividade antioxidante por ABTS (ácido 2,2-azinobis-3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico).....	31
2.5.3. Atividade antioxidante por DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil.....	31
2.6. Análise estatística.....	31
3. Resultados e discussão.....	32
3.1. Ajuste do modelo e análise estatística.....	32
3.2. Efeito do ultrassom no rendimento do fucoidano.....	34
3.3. Otimização e validação do modelo.....	36
3.4. Composição do fucoidano.....	36

3.5. Atividade antioxidante.....	40
3.6. Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR).....	42
3.7. Ressonância magnética nuclear ( <sup>1</sup> H NMR).....	43
4. Conclusão.....	44
5. Referências.....	45
Capítulo 2. Formulação de matriz polimérica com fucoidano, agar e alginato de sódio com potencial aplicação em impressão 3D: Caracterização e printabilidade .....	53
Resumo.....	54
1. Introdução.....	56
2. Materiais e métodos.....	58
2.1. Material.....	58
2.2. Extração do fucoidano.....	58
2.3. Formulação dos hidrogéis.....	59
2.4. Potencial zeta, diâmetro da partícula e índice de polidispersão (PDI) e pH.....	60
2.5. Análises reológicas.....	60
2.6. Espectroscopia no infravermelho na região média (MIR-ATR).....	61
2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	62
2.8. Aparência visual e estabilidade das formulações.....	62
2.9. Processo de impressão e printabilidade.....	62
2.9.1. Precisão de deposição (DA) e taxa de espalhamento (SR).....	62
2.9.2. Impressão 3D.....	63
2.9.3. Análise do perfil de textura (TPA).....	63
2.10. Análises estatísticas.....	64
3. Resultados e discussão.....	64
3.1. Potencial zeta ( $\zeta$ ), diâmetro de partícula, PDI e pH.....	64
3.2. Propriedades reológicas do fucoidano e das matrizes poliméricas.....	66
3.3. Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR).....	72
3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	73
3.5. Aparência visual e estabilidade das formulações.....	75
3.6. Precisão de deposição (DA) e taxa de espalhamento (SR).....	76
3.7. Impressão 3D e análise do perfil de textura (TPA).....	78

<b>4. Conclusão.....</b>	<b>80</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>81</b>
<b>3. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>87</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As algas desempenham um papel fundamental como organismos fotossintéticos e autotróficos no ecossistema, dividindo-se em grupos distintos, tais como verdes (*Chlorophyta*), pardas (*Phaeophyceae*) e vermelhas (*Rhodophyta*). Esses grupos são ricos em compostos bioativos e polissacarídeos, que podem ser aplicados em diversos setores industriais como farmacêutico, alimentício, cosmético e biomédico (Abraham et al., 2019; Leyton et al., 2016). As algas pardas destacam-se por sua composição estrutural que inclui polissacarídeos (alginato, celulose, laminarina e fucoidano), polifenóis (florotaninos), proteínas e vitaminas (Abraham et al., 2019; Zhang et al., 2018).

Dentre estes compostos de interesse, destaca-se o fucoidano devido às suas atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobiana (Poveda-Castillo et al., 2018), antiviral (Pradhan et al., 2022), anti-inflamatória (Apostolova et al., 2020), antidiabética (Kumar et al., 2015), antitumoral (Luo et al., 2023), anticoagulante (Wang et al., 2010) e atividade antioxidante (Chen et al. 2021; Yu et al., 2021; Laeliocattleya et al., 2023). Este polissacarídeo sulfatado está presente na parede celular de algas pardas (Alboofetileh et al., 2019) e apresenta uma complexidade em sua estrutura, caracterizada pela presença dominante de sulfato e fucose e menores proporções de outros monossacarídeos como glicose, galactose, manose, xilose, ramnose, ácido glucurônico, ácido galacturônico e acetato (Mabate et al., 2021). Devido à sua complexidade, a estrutura do fucoidano pode apresentar dois tipos de cadeia principal: constituída por  $\alpha$ -L-fucose sulfatada ligadas por ligações glicosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 3) ou constituída por ligações glicosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 3) alternadas com ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 4) (Zayed et al., 2023). Dentre as atividades biológicas apresentadas pelo fucoidano, destaca-se a atividade antioxidante (Chen et al., 2021; Yu et al., 2021; Laeliocattleya et al., 2023, no entanto, fatores como grau de sulfatação, composição de monossacarídeos e massa molecular influenciam atividades biológicas do fucoidano (Mabate et al., 2021). Com relação a massa molecular, o fucoidano pode ser classificado como de baixa, média ou alta massa molecular, relacionado ao método de extração utilizado (Lim et al., 2014).

Os métodos convencionais de extração do fucoidano são baseados em extração aquosa ácida que utiliza ácido clorídrico (Lorbeer et al., 2015; Floréz-Fernández et al., 2023). Porém, o uso deste ácido pode causar degradação das cadeias de fucose e quebra dos grupamentos sulfatos (Flórez-Fernandez et al., 2018). A substituição do HCl pelo ácido cítrico pode ser efetiva, uma vez que este último é um ácido fraco utilizado na indústria alimentícia. Existem métodos alternativos para a extração do fucoidano, como a extração assistida por ultrassom (EAU), a qual destaca-se pela eficiência e baixo consumo de solvente (Chemat et al., 2017). Portanto, visando aumentar o rendimento do polissacarídeo, a combinação de metodologias e substituição de solventes pode ser interessante (Fawzy & Gomaa, 2021), favorecendo a extração do fucoidano com diferentes massas moleculares (Zayed et al., 2023).

A utilização de polissacarídeos derivados de algas abrange uma ampla gama de setores como farmacêutico, biomédico, ambiental e alimentício (Mandal et al., 2023). Alguns polissacarídeos como alginato de sódio são amplamente empregados como espessantes e gelificantes (Wang et al., 2021). Além destas aplicações tradicionais, existe uma notável expansão no uso destes polissacarídeos para formulação de hidrogéis. Essas matrizes poliméricas têm ganhado destaque devido à sua versatilidade e aplicabilidade em diversas áreas da pesquisa como engenharia de tecidos, farmacêutica, alimentícia, cosmética e biomédica (Kaliaraj et al., 2023).

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais insolúveis, com capacidade de retenção de água. Dentre as metodologias de elaboração destas matrizes, destaca-se os hidrogéis responsivos à temperatura. As matrizes formadas por gelificação térmica se destacam por sua reversibilidade, passando de estado fluído para gel com a mudança da temperatura (Niemczyk-Soczynska et al., 2022). Estes hidrogéis podem ser aplicados como materiais precursores para impressão 3D, devido sua capacidade serem moldados em qualquer forma e tamanho (Xie et al., 2023). No entanto, alguns polissacarídeos possuem limitações quanto a suas propriedades mecânicas e reológicas como o fucoidano, o qual possui baixa viscosidade e nenhuma capacidade de formação de gel (Brovko et al., 2023), diferente do alginato de sódio e ágar. Portanto, a mistura de polímeros é utilizada para alcançar melhores propriedades reológicas e estabilidade dos hidrogéis. Diversos estudos reportam a combinação de ágar com alginato de sódio na elaboração de hidrogel com uso de um

agente reticulante ( $\text{CaCl}_2$ ) (Wang et al., 2021; Wan et al., 2023). Por outro lado, o estudo de Reys et al. (2023) reportou a formação de hidrogel com ágar e fucoidano por meio da gelificação térmica sem o uso de agentes reticulantes. Já a interação entre fucoidano e alginato de sódio foi investigada por Brovko et al., (2023) que demonstrou a interação entre esses polímeros, através de um sistema cooperativo de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila do alginato de sódio e fucoidano, além de interações hidrofóbicas. Conforme o exposto, a combinação fucoidano, ágar e alginato de sódio revela potencial para formação de um hidrogel com boas características mecânicas e reológicas que podem ser aplicados como material precursor na impressão de estruturas 3D devido sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (Giliomee et al., 2022).

Desta forma, o Capítulo 1 aborda a extração do fucoidano da alga *Sargassum cymosum* C. Agardh e otimização do rendimento através de delineamento experimental do tipo Box-Behnken com as variáveis razão solvente/biomassa ( $20 \text{ mL g}^{-1}$  a  $40 \text{ mL g}^{-1}$ ), tempo (3 a 15 min) e potência ultrassônica (80 a 240 W). Além disso, o polissacarídeo extraído foi caracterizado por análises químicas (carboidratos, sulfato, fucose, proteínas e fenólicos), estruturais (composição monossacarídica, massa molecular, espectroscopia de Infravermelho na região média (MIR-ATR) e ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H NMR}$ )) e avaliação do potencial antioxidante através de ensaios com diferentes radicais (DPPH, ABTS e FRAP). Por fim, o Capítulo 2 aborda a elaboração de um hidrogel utilizando o fucoidano extraído na condição otimizada (1g de biomassa/27 mL de solvente, 11 min e 240 W) alcançada no Capítulo 1, alginato de sódio e ágar comerciais com avaliação das matrizes quanto às suas características físicas (reologia, potencial zeta, diâmetro da partícula, e índice de polidispersão (PDI)) e estruturais (MIR-ATR e microscopia eletrônica de varredura (MEV)). Além disso, as formulações foram avaliadas visualmente e aplicadas na impressão de filamentos para avaliação da printabilidade, por meio da precisão de deposição (DA) e taxa de espalhamento (SR) em diferentes diâmetros de agulha (0,8 mm e 1,2 mm) e velocidades de impressão (2, 10, 20 mm/s) e finalmente a impressão de estruturas 3D (cubos), avaliadas por meio de precisão de impressão, estabilidade e textura.

## 2. OBJETIVO GERAL

Otimizar o rendimento de fucoidano extraído da alga *Sargassum cymosum* C. Agardh e avaliar o seu emprego na elaboração de uma matriz polimérica visando sua aplicação na impressão 3D.

### 2.1. Objetivos específicos

#### **Capítulo 1: Otimização da extração de fucoidano de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh por ultrassom: caracterização química e estrutural**

- Estudar a influência das variáveis independentes razão solvente/biomassa, tempo e potência ultrassônica no rendimento do fucoidano e validar o delineamento;
- Avaliar as características químicas (carboidratos, sulfato, fucose, compostos fenólicos totais e proteínas) e estruturais (composição monossacarídica, massa molecular, MIR-ATR, <sup>1</sup>H NMR) do fucoidano;
- Examinar a potencial atividade antioxidante do polissacarídeo obtido por meio de diferentes radicais (ABTS, DPPH e FRAP).

#### **Capítulo 2: Formulação de matriz polimérica com fucoidano, agar e alginato de sódio com potencial aplicação em impressão 3D: Caracterização e printabilidade**

- Elaborar diferentes formulações de hidrogel utilizando o fucoidano extraído por extração assistida por ultrassom (EAU) da alga *Sargassum cymosum* C. Agardh, combinado com o ágar e alginato de sódio comerciais;
- Avaliar características físicas (reologia, potencial zeta, diâmetro da partícula e índice de polidispersão), químicas (pH) e estruturais (MIR-ATR e MEV) das matrizes formadas;
- Investigar os parâmetros de impressão: diâmetro da agulha (0.8 e 1.2 mm) e velocidade de impressão (2, 10 e 20 mm/s) através da impressão de filamentos

de 60 mm e avaliação da printabilidade (precisão de deposição (DA) e taxa de espalhamento (SR));

- Impressão de modelos cúbicos 3D, empregado os melhores parâmetros encontrados no teste de printabilidade e avaliar a precisão de impressão, estabilidade e textura.

**Capítulo 1 – Otimização da extração de fucoidano de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh por ultrassom: caracterização química e estrutural<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Este capítulo foi formatado de acordo com a revista Food Research International (ISSN: 0963-9969)

## Resumo

O fucoidano é um polissacarídeo composto por sulfato, fucose e outros monossacarídeos, que apresenta atividades biológicas e antioxidantes. Neste estudo, o fucoidano foi obtido de *Sargassum cymosum* C. Agardh utilizando isolamento assistido por ultrassom e substituições de HCl por ácido cítrico na etapa ácida. O Box-Behnken Design foi escolhido para otimizar a extração de polissacarídeos variando a proporção solvente/biomassa, tempo de extração e potência ultrassônica para melhorar o rendimento de fucoidano. Um modelo polinomial quadrático descreveu satisfatoriamente a resposta do rendimento. Na condição otimizada obteve-se rendimento de  $17,12\% \pm 0,24$  (1 g de biomassa/27 mL de solvente, 11 minutos e 240 W de potência ultrassônica), sendo a maior influência positiva no rendimento exercida pela potência ultrassônica. O fucoidano apresentou baixa massa molecular (8 kDa), moderado teor de sulfatos ( $24,5\% \pm 0,003$ ) e baixos teores de contaminantes (proteínas e polifenóis). O fucoidano exibiu atividade antioxidante no ensaio ABTS ( $22,1 \pm 0,005 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ). Os principais monossacarídeos foram a fucose, galactose, glicose e ácido glucurônico. A combinação da extração assistida por ultrassom com ácido cítrico foi benéfica para a extração de fucoidano, diminuindo o tempo do processo e aumentando o rendimento. A composição do fucoidano sugere potencial atividade prebiótica e anti-inflamatória, que poderia ser explorada em pesquisas futuras como suplemento dietético para melhorar a saúde humana.

**Palavras-chave:** Fucoidano. Sulfato. Heteropolissacarídeo. Box-Behnken Design. *Sargassum sp.*

## Abstract

Fucoidan is a polysaccharide composed of sulfate, fucose, and other monosaccharides, which exhibits biological and antioxidant activities. In this study, fucoidan was obtained from *Sargassum cymosum* C. Agardh using ultrasound-assisted isolation and replacements of HCl with citric acid in the acidic step. Box-Behnken Design was chosen to optimize the polysaccharide extraction by varying the solvent/biomass ratio, extraction time, and ultrasonic power to improve fucoidan yield. A quadratic polynomial model satisfactorily described the yield response. In the optimized condition,  $17.12\% \pm 0.24$  yield was obtained (1 g of biomass/27 mL of solvent, 11 minutes and 240 W of ultrasound power), with the greatest positive influence on yield being exerted by ultrasonic power. Fucoidan presented a low molecular weight (8 kDa), with a moderate sulfate content ( $24.5\% \pm 0.003$ ) and low levels of contaminants (proteins and polyphenols). Fucoidan exhibited antioxidant activity in the ABTS assay ( $22.1 \pm 0.005 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ). The main monosaccharides were fucose, galactose, glucose, and glucuronic acid. The combination of ultrasound-assisted extraction with citric acid was beneficial for fucoidan extraction, decreasing process time and increasing yield. The fucoidan composition suggests potential prebiotic and anti-inflammatory activity, which could be explored in future research as a dietary supplement to improve human health.

**Keywords:** Fucoidan. Sulfate. Heteropolysaccharide. Design Box-Behnken. *Sargassum sp.*

## 1. Introdução

O fucoidano é um polissacarídeo caracterizado pela presença de sulfato e fucose, com pequenas quantidades de outros monossacarídeos, como galactose, xilose, glicose, manose, ramnose, arabinose e ácidos urônicos (Mabate et al., 2021). Esse polissacarídeo pode ser encontrado na parede celular de algas pardas e em certos invertebrados marinhos (Tsou et al., 2022), com rendimento entre 0,5% a 33% (Hans et al., 2023). O fucoidano têm recebido atenção devido às suas notáveis atividades biológicas, tais como antioxidante, capacidade prebiótica, anticoagulante, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antimicrobiana, entre outras (Anisha et al., 2022). As atividades biológicas do fucoidano estão diretamente relacionadas à sua composição estrutural, massa molecular, métodos de extração, origem geográfica, fase reprodutiva, estressores ambientais, espécie e estação de colheita (Lakshmanan et al., 2022). Em relação a massa molecular, o fucoidano pode ser classificado como de baixa (LMWF), média (MMWF) ou alta massa molecular (HMWF). Muitos estudos relataram que o LMWF possui maior atividade biológica do que o HMWF (Yu et al., 2021; Chen et al., 2021; Tan et al., 2023).

A extração deste polissacarídeo pode ser realizada por metodologias convencionais e não convencionais, as quais influenciam na composição físico-química, conformações moleculares e atividades biológicas *in vitro* do fucoidano (Wang et al., 2021). As técnicas convencionais são baseadas em extração aquosa (água quente, soluções ácidas ou alcalinas). No entanto, esses métodos têm desvantagens como alta demanda de tempo e energia, uso de solventes ambientalmente tóxicos e baixo rendimento (Floréz-Fernández et al., 2023). Em contraste, há uma tendência de aplicar tecnologias verdes, como a extração assistida por ultrassom (EAU) (Mensah et al., 2023).

A extração assistida por ultrassom é uma opção atraente para a extração de polissacarídeos, pois seu uso pode ser independente ou combinado com outras técnicas (Mapholi & Goosen, 2023). O ácido clorídrico é utilizado na extração ácido do fucoidano, no entanto, esse ácido degrada as cadeias de fucose e quebra os grupos sulfato do polissacarídeo (Flórez-Fernández et al., 2018). Como substituto do HCl, existe o ácido cítrico, que pode ser eficaz por ser um ácido orgânico fraco, usado

na indústria alimentícia como aditivo. A combinação de EAU e ácido cítrico pode levar ao aumento no rendimento (Fawzy & Gomaa, 2021) e também produzir fucoidano de baixa massa molecular (LMFW) (Zayed *et al.*, 2023). Durante o processo de extração ácida do fucoidano ocorre a co-extração de ácidos algínicos. Para purificação do fucoidano, a eliminação destes componentes insolúveis pode ser realizada com adição de sais como o  $\text{CaCl}_2$  (Hifney *et al.* 2016). Assim, a escolha da metodologia e etapas de purificação são cruciais para extração do polissacarídeo, pois influenciam nas características químicas, estruturais e bioativas do fucoidano isolado (Laeliocattleya *et al.*, 2023).

Conforme exposto, o objetivo deste estudo foi combinar a extração assistida por ultrassom (EAU) e ácido cítrico no tratamento ácido, em substituição ao HCl, para a extração de fucoidano da alga parda *Sargassum cymosum* C. Agardh, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) e o delineamento experimental do tipo Box-Behnken (BBD), para avaliar a influência da razão de solvente/biomassa, tempo de extração e potência ultrassônica no rendimento de fucoidano. O fucoidano extraído foi caracterizado através de análises químicas (conteúdo de sulfato, fucose, carboidratos, proteína e teor total de polifenóis), estruturais (composição de monossacarídeos, MIR-ATR,  $^1\text{H}$  NMR e massa molecular) e atividade antioxidante, investigada pela capacidade do polissacarídeo de capturar os radicais DPPH, FRAP e ABTS.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material algal**

As algas do gênero *Sargassum cymosum* C. Agardh, coletadas em Praia Grande, Ubatuba, São Paulo, Brasil (23°28'00"S – 45°03'36"W), foram lavadas com água corrente e sanitizadas em água clorada (25 ppm) por 30 minutos, seguido por centrifugação em uma centrífuga doméstica para remover o excesso de água. As algas foram secas em estufa (Modelo 420-1D, Ethik Technology, Vargem Grande Paulista, Brasil) a 45 °C por 12 h, trituradas em um moinho facas e o pó de alga armazenado em recipientes herméticos, à ausência de luz e temperatura ambiente.

## 2.2. Extração do fucoidano

### 2.2.1. Pré-tratamento da alga

As algas secas e moídas (7 g) foram imersas em 50 mL de etanol (99%), sob agitação por 3 horas em um agitador orbital (Modelo TE-141, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), o etanol descartado e o processo repetido mais uma vez. O material foi filtrado à vácuo e seco em estufa (Modelo 420-1D, Ethik Technology) a 40 °C (Nogueira et al., 2022). O pré-tratamento da alga visa remover pigmentos, componentes fenólicos e proteínas.

### 2.2.2. Extração do fucoidano

O material pré-tratado e seco, em diferentes razões de biomassa e solvente (Tabela 1) foi misturado com água e solução de ácido cítrico (20% p/v) até atingir pH final 1.5 (Fawzy & Gomaa, 2021). Ondas ultrassônicas foram aplicadas às suspensões com uma sonda de 12,7 mm de diâmetro (OR-T-500, OMNI International™, frequência de 20 kHz e potência máxima de 400W) em diferentes tempos e potências (Tabela 1). O sobrenadante foi separado da alga residual, e cloreto de cálcio (3% p/v) foi adicionado ao filtrado (1:1 v/v) e a solução mantida durante a noite a 4°C para remover o alginato de sódio co-extraído durante o tratamento ácido (Hifney et al., 2016), visando a purificação do material. A solução foi centrifugada (4000 rpm por 30 min) para separar o alginato de sódio precipitado, ao sobrenadante adicionado etanol (99%) (1:2 v/v) e a solução resultante foi mantida durante a noite a 4 °C (Hifney et al., 2016) para precipitação do polissacarídeo. O fucoidano foi recuperado por centrifugação (4000 rpm por 30 min), seco em estufa a 60 °C (Fawzy & Gomaa, 2021), e armazenado em um dessecador até posterior análises. O rendimento de fucoidano foi calculado usando a Equação 1:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Peso seco do Fucoidano}}{\text{Peso seco da alga pré - tratada}} \times 100 \quad (1)$$

## 2.3. Delineamento experimental

BBD foi selecionado para otimizar o rendimento de fucoidano extraído por meio da EAU. As variáveis independentes estudadas foram a razão solvente/biomassa ( $X_1$ ), o

tempo de extração ( $X_2$ ) e a potência do ultrassom ( $X_3$ ), enquanto a variável dependente foi o rendimento. O delineamento experimental consistiu em 17 experimentos, com 5 repetições do ponto central. As variáveis independentes estudadas razões solvente/biomassa (20 a 40 mL g<sup>-1</sup>), tempo de extração (3 a 15 min) e potência ultrassônica (80 a 240 W) estão apresentadas na Tabela 1 e os limites de cada tratamento foram estabelecidos conforme estudos prévios que aplicaram ultrassom para extração de alginato e fucoidano de algas pardas (Alboofetileh et al., 2019). A variável resposta foi ajustada ao modelo polinomial quadrático (Eq. 2).

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

onde Y é a resposta prevista;  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes codificadas;  $\beta_0$  é o intercepto (constante do modelo);  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  são os coeficientes lineares, quadráticos e de interação, respectivamente.

A significância estatística dos coeficientes na equação foi avaliada por análise de variância (ANOVA) com  $p \leq 0,05$ . O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) forneceu a qualidade de ajuste do modelo polinomial aos dados experimentais e a falta de ajuste foi avaliada pelo teste F. A otimização das variáveis independentes (razão solvente/biomassa, tempo de extração e potência ultrassônica) para obter o rendimento máximo foi realizada utilizando a Função de Desejabilidade (Derringer and Suich, 1980). O *software* Design Expert 13 (StatEase Inc., Minneapolis, EUA) foi utilizado para realizar o delineamento experimental, análise estatística de dados e modelagem de regressão.

## 2.4. Características químicas e estruturais do fucoidano

### 2.4.1. Composição química

O conteúdo total de açúcar foi determinado usando o método fenol-ácido sulfúrico, com glicose como padrão (Dubois et al., 1956). O teor de sulfato foi

quantificado pelo método gelatina-bário descrito por Dodgson & Price (1962), com sulfato de potássio como padrão. O conteúdo de fucose foi analisado de acordo com Dische & Shettles (1948), com L-fucose como padrão. O teor de proteína foi determinado por Bradford (1976), com albumina de soro bovino como padrão. Os polifenóis foram determinados utilizando a metodologia de Singleton e Rossi (1965), com ácido gálico como padrão e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de fucoídano em base seca (mg GAE g<sup>-1</sup>).

#### **2.4.2. Análise da massa molecular**

A massa molecular do fucoídano foi analisado por cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho acoplada com detector de índice de refração (HPSEC-RID) usando um Sistema 1250 Infinity (Agilent, Santa Clara, CA). O polissacarídeo foi diluído em água ultra purificada (1 mg/mL) e injetado (25 µL) no sistema. A separação foi realizada através de quatro colunas PL aquagel-OH MIXED-M (300 x 7,5 mm, 8 µm) em sequência. NaNO<sub>3</sub> (0,2 M) foi utilizado como eluente a 35 °C à um fluxo de 0,6 mL/min. Os padrões externos foram dextranas da série T (5, 25, 50, 80, 150 e 410 kDa; Fluka<sup>TM</sup>) (Prado et al., 2016, 2017).

#### **2.4.3. Composição de monossacarídeos**

A composição de monossacarídeos do fucoídano foi avaliada usando cromatografia de troca iônica de alto desempenho com detecção pulsada amperométrica (HPAEC-PAD, Dionex, EUA) equipada com uma coluna de troca iônica CarboPac PA10 (250 mm x 4 mm) (Dionex Corp., Sunnyvale, EUA). Cada amostra (5 mg) foi hidrolisada com 1 mL de ácido trifluoroacético 2 M a 120 °C por 90 min. Um fluxo constante de gás nitrogênio foi utilizado para secar a amostra, 1,5 mL de álcool terciário de butílico (TBA) foi adicionado, e a amostra foi devolvida para secagem com nitrogênio. A amostra seca foi dissolvida em água deionizada até atingir pH 6 para manter a integridade da coluna. As amostras foram filtradas através de uma membrana de 0,45 µm e injetadas no sistema HPAEC-PAD. Padrões de monossacarídeos foram utilizados para preparar curvas de calibração para açúcares neutros (fucose, arabinose, rhamnose, galactose, glucose, xylose e mannose) e

padrões de ácidos urônicos (ácidos galacturônico e glucurônico) (Shiga, Cordenosi & Lajolo, 2009).

#### **2.4.4. Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR)**

A técnica analítica conhecida como Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR) é empregada na identificação de grupos funcionais em moléculas, na determinação da composição química e nas interações moleculares presentes em uma amostra. Frequentemente aplicada em materiais poliméricos, essa metodologia permite a investigação de características como a presença de grupos funcionais, o grau de polimerização e as ramificações. Assim, o fucoidano foi avaliado por esta técnica, sendo os espectros registrados, na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , em um espectrômetro PerkinElmer Spectrum One, adquirindo 32 varreduras com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  em temperatura ambiente.

#### **2.4.5. Análise de ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$ NMR)**

A composição química do fucoidano foi determinada por  $^1\text{H}$  NMR em espectrômetro Bruker Avance III (Karlsruhe, BW, Alemanha), operando a 400 MHz. As amostras foram solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  (óxido de deutério) e os espectros foram registrados a 60 °C. TSP-d4 (sal de sódio do ácido trimetilsilil propiônico) foi utilizado como referência.

### **2.5. Atividade antioxidante**

#### **2.5.1. Poder Antioxidante redutor férrico (FRAP)**

A determinação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP) foi realizada utilizando a metodologia descrita por Benzie & Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado pela mistura de 10 mL de tampão acetato (0.3 M e pH 3.6), 1 mL of TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil) -s-triazina) (10 mM em 40 mM HCl) e 1 mL of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (20 mM). Amostras (90  $\mu\text{L}$ ) e água destilada (270  $\mu\text{L}$ ) foram misturadas com o reagente FRAP (2,7 mL) e incubadas por 30 min a 37 °C. A absorbância foi registrada a 595 nm em espectrofotômetro e Trolox utilizado como padrão. O branco consistiu apenas no

reagente FRAP. O resultado foi expresso em mg de Equivalentes de Trolox (TE)/ g de fucoidano seco (mg TE g<sup>-1</sup>).

### **2.5.2. Atividade antioxidante por ABTS (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)**

A determinação da atividade antioxidante por meio do sequestro de radicais ABTS (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi realizada utilizando a metodologia de Rufino et al. (2010). O radical ABTS foi preparado pela mistura de solução estoque de ABTS (7 mM) com solução de persulfato de potássio (140 mM) por 16 horas à temperatura ambiente. O radical ABTS foi diluído em etanol até atingir uma absorvância de 0,7 a 734 nm. O fucoidano foi diluído em diferentes concentrações, misturado com a solução do radical ABTS e mantido no escuro por 6 minutos. A absorvância foi medida a 734 nm em espectrofotômetro. Etanol absoluto foi utilizado como branco. Uma curva padrão foi preparada com Trolox e o resultado foi expresso em µmol de Equivalentes de Trolox (TE) por g de fucoidano seco (µmol TE g<sup>-1</sup>).

### **2.5.3. Atividade antioxidante por DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)**

A atividade antioxidante por meio do sequestro de radicais DPPH do fucoidano foi determinada pela metodologia descrita por Borges (2016). Amostras (150 µL) de solução de fucoidano (1%) foram adicionadas a 5,85 mL de solução de DPPH (0,06 mM). A solução foi misturada e incubada no escuro por 30 minutos, e a absorvância foi medida a 515 nm. Trolox foi utilizado para padronizar, e o resultado foi expresso em µmol de equivalentes de Trolox por g de fucoidano seco (µmol TE g<sup>-1</sup>).

## **2.6. Análises estatísticas**

Os experimentos das atividades antioxidantes foram conduzidos em triplicata, e os resultados apresentados como valores médios ± desvios padrão. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para identificar diferenças significativas com o teste de Tukey (p≤0,05). As análises estatísticas e o espectro MIR-ATR foram realizados

utilizando o software Microcal™ Origin® 8.5 (Microcal, Northampton, MA, EUA). O software TopSpin 4.3.0 foi utilizado para análise de <sup>1</sup>H NMR.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Ajuste do modelo e análise estatística

O rendimento de fucoídano de *Sargassum cymosum* C. Agardh variou de 8,00 (tratamento 16) a 17,18% (média do ponto central) (Tabela 1). A Tabela 2 mostra a análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático ajustado ao rendimento de fucoídano. A forma geral do polinômio de segunda ordem foi apresentada na equação 3. De acordo com os resultados, alto valor de F (23,61) e um baixo valor de *p* (0,0002) indicam que a adequação do modelo foi significativa. Os valores elevados do coeficiente de determinação ( $R^2=0,96$ ) e do coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj}=0,92$ ) estavam razoavelmente próximos de 1, indicando um modelo satisfatório. Os coeficientes lineares ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ), quadráticos ( $X_1^2$  e  $X_2^2$ ) e de produto cruzado ( $X_1.X_3$  e  $X_2.X_3$ ) tiveram um efeito significativo, com  $p \leq 0,05$ .

$$Y = 16,22 + 0,79 * X_1 - 1,04 * X_2 + 1,43 * X_3 - 1,85 * X_1X_3 + 1,63 * X_2X_3 - 2,97 * X_1^2 - 1,03 * X_2^2 \quad (4)$$

**Tabela 1.** Delineamento experimental Box-Behnken com variáveis codificadas e reais ( $X_1$ : Razão Solvente/Biomassa;  $X_2$ : Tempo;  $X_3$ : Potência ultrassônica) e resposta (Rendimento de fucoidano (%)).

Tratamento	Variáveis codificadas			Variáveis reais			Resposta
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Solvente/ Biomassa (mL g <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Potência (W)	Rendimento (%)
1	0	0	0	30	9	160	15,95
2	-1	0	1	20	9	240	15,15
3	-1	-1	0	20	3	160	12,03
4	0	0	0	30	9	160	15,90
5	0	-1	1	30	3	240	15,07
6	0	0	0	30	9	160	17,18
7	0	1	1	30	15	240	16,19
8	0	-1	-1	30	3	80	16,03
9	1	1	0	40	15	160	11,26
10	1	0	1	40	9	240	13,38
11	0	0	0	30	9	160	16,84
12	0	0	0	30	9	160	15,23
13	1	0	-1	40	9	80	13,65
14	-1	1	0	20	15	160	11,18
15	1	-1	0	40	3	160	14,44
16	-1	0	-1	20	9	80	8,00
17	0	1	-1	30	15	80	10,64

**Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático ajustado ao rendimento de fucoidano

	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	Valor-F	Valor-p	
<b>Modelo</b>	102,51	9	11,39	23,61	0,0002	significante
<b>X<sub>1</sub> – Solvente/Biomassa</b>	5,08	1	5,08	10,53	0,0141*	
<b>X<sub>2</sub> - Tempo</b>	8,62	1	8,62	17,87	0,0039*	
<b>X<sub>3</sub> - Potência</b>	16,43	1	16,43	34,06	0,0006*	
<b>X<sub>1</sub>.X<sub>2</sub></b>	1,36	1	1,36	2,82	0,1370	
<b>X<sub>1</sub>.X<sub>3</sub></b>	13,75	1	13,75	28,51	0,0011*	
<b>X<sub>2</sub>.X<sub>3</sub></b>	10,60	1	10,60	21,97	0,0022*	
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	37,10	1	37,10	76,90	< 0,0001*	
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	4,43	1	4,43	9,18	0,0191*	
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	2,12	1	2,12	4,40	0,0741	
<b>Residual</b>	3,38	7	0,4824			
<b>Perda de Ajuste</b>	0,8993	3	0,2998	0,4840	0,7113	não significante
<b>Erro Puro</b>	2,48	4	0,6194			
<b>Total</b>	105,89	16				
R <sup>2</sup> = 0,9681		R <sup>2</sup> ajustado= 0,9271				

\*Valores estatisticamente significativos; R<sup>2</sup>=Coeficiente de determinação; gl=graus de liberdade

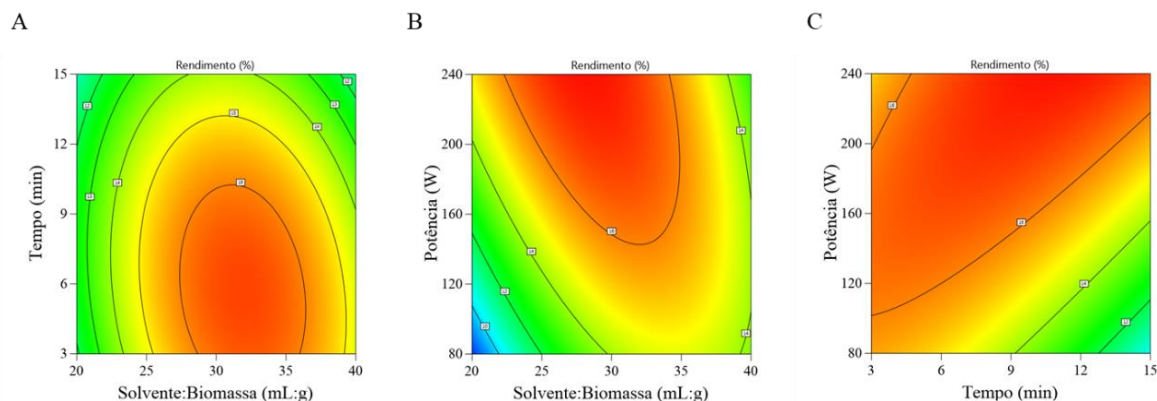
### 3.2. Efeito do ultrassom no rendimento do fucoidano

A Figura 1 mostra as curvas de contorno da relação entre as variáveis independentes da extração (razão solvente/biomassa, tempo e potência ultrassônica)

e o rendimento de fucoidano. A Figura 1A mostra o efeito da razão solvente/biomassa ( $X_1$ ), tempo ( $X_2$ ) e sua interação entre eles no rendimento de fucoidano. A razão solvente/biomassa exerceu um efeito positivo no rendimento, isto é, o aumento de solvente facilitou a solubilização e difusão do polissacarídeo na solução assim como verificado por Alboofetileh et al. (2019). Por outro lado, o tempo exibiu um efeito negativo na extração do polissacarídeo, atribuído ao contato prolongado com o solvente e ultrassom sugerindo que o fucoidano extraído no início foi exposto à degradação, potencialmente causada pela instabilidade térmica corroborado pelos estudos de Zhu et al. (2015), Thao My et al. (2020) e Fawzy & Gomaa (2021).

A Figura 1B demonstra a relação entre a razão solvente/biomassa ( $X_1$ ) e a potência ultrassônica ( $X_3$ ). Os resultados indicam que a combinação da potência do ultrassom e razão solvente/biomassa contribuiu para a melhoria no rendimento de fucoidano, uma vez que o aumento da potência ultrassônica facilita a penetração da solução ácida na matriz algal. As ondas ultrassônicas são propagadas através do meio e induzem uma sucessão de ciclos de compressão e expansão, causando um fenômeno de cavitação que leva à produção, crescimento e colapso de bolhas cheias de gás e vapor (Chemat et al., 2017). A implosão das bolhas gera micro-turbulência, colisões entre partículas de alta velocidade e perturbação em partículas microporosas, acelerando a difusão interna e turbulenta (Flórez-Fernández et al., 2019). Essas forças de cisalhamento elevadas, causadas pela cavitação próxima à parede celular, provocam a descamação e erosão da superfície, facilitando a difusão do polissacarídeo na solução de extração (Flórez-Fernández et al., 2019; Zhu et al., 2015; Alboofetileh et al., 2019).

A Figura 1C revela a influência positiva entre a interação tempo ( $X_2$ ) e potência ultrassônica ( $X_3$ ), no rendimento de fucoidano. Entretanto, é importante observar que um tempo prolongado, associado a uma potência ultrassônica mais elevada, poderia resultar na degradação do fucoidano como observado por Thao My et al., 2020.



**Figura 1.** Curvas de contorno exibindo a influência da razão solvente/biomassa, tempo de extração e potência ultrassônica no rendimento de fucoidano

### 3.3. Otimização e validação do modelo

Neste estudo, o software Design Expert 13 sugeriu a condição otimizada: razão solvente/biomassa de 27 mL/g, tempo de extração de 11 min e, 240 W de potência ultrassônica, com e um rendimento máximo previsto de fucoidano de 17,16% e valor de desejabilidade de 0,997. Para validar a equação do modelo, a extração do fucoidano foi conduzida sob as condições otimizadas, em triplicata, alcançando um rendimento próximo ao previsto ( $17,12\% \pm 0,24$ ). Portanto, o modelo foi satisfatório para prever o efeito de cada parâmetro (razão solvente/biomassa, tempo e potência ultrassônica) no rendimento de fucoidano. Além disso, o rendimento obtido foi superior aos estudos de Alboofetileh et al. (2019) (3,51%), Wan et al. (2015) (5,75%), Hanjabam et al. (2019) (14,61%) que utilizaram EAU. Também foi maior que Fawzy & Gomaa (2021) (6,55%) que utilizaram tratamento com ácido cítrico, Saravana et al. (2018) (13,56%), com hidrólise subcrítica da água e Hanjabam et al. (2019) (10,59%) com água acidificada com HCl (pH 2). Essas discrepâncias nos resultados mostram que o método de extração tem papel crucial no rendimento do fucoidano e em suas características químicas (Alboofetileh et al. 2019).

### 3.4. Composição do fucoidano

A variação das espécies de algas pardas, assim como do método de extração, tem impacto na composição química e propriedades biológicas do fucoidano extraído

(Laeliocattleya et al. 2023). O total de carboidratos do fucoidano foi  $36,34\% \pm 0,01$ , estando dentro da faixa observada por Huang et al. (2023) e Wang et al. (2016) ( $27,1\% \pm 1,7$  a  $61,71\% \pm 9,71$ ) para a espécie *Sargassum* spp.

Os grupos sulfatos desempenham um papel crucial na sua caracterização e nas propriedades biológicas do fucoidano, como atividade antioxidante (Li et al. 2023). O resultado alcançado ( $24,5\% \pm 0,003$ ) para o teor de sulfato foi menor que o encontrado por Guo et al. 2014 ( $31,22\%$  a  $34,72\%$ ), porém maior do que encontrado por Laeliocattleya et al. (2023) ( $6,24\% \pm 0,04$ ) e Alboofetileh et al. (2019) ( $22,97\% \pm 0,29$ ) quando utilizado o método de extração assistida por ultrassom (EAU), considerado um conteúdo moderado de sulfato. A fucose é um monossacarídeo essencial para caracterizar o polissacarídeo e também está relacionada às propriedades biológicas. Assim, a quantificação de fucose confirma o isolamento da molécula de fucoidano extraído de *Sargassum cymosum* C. Agardh. O resultado do teor de fucose deste estudo ( $26,7 \pm 0,01$  mg/g de fucoidano) foi semelhante ao relatado por January et al. (2019) utilizando extração ácida (HCl) com diferentes tipos de algas (*E. maxima* 26 mg/g e *L. pallida* 33 mg/g de fucoidano). A quantificação de proteínas e polifenóis no polissacarídeo extraído é importante, pois estes são considerados impurezas do material, sendo co-extraídos durante o processo de extração, conseqüentemente diminuem a pureza do fucoidano (Zayed et al., 2023; Laeliocattleya et al., 2023). Neste estudo, o pré-tratamento com etanol (99%) foi aplicado para remover proteínas e polifenóis e os resultados mostraram baixo teor de proteínas nas amostras ( $0,70\% \pm 0,01$ ), dentro da faixa observada por Laeliocattleya et al. (2023) (0,00 a  $1,44 \pm 0,46$ ) utilizando extração assistida por ultrassom (UAE), e menor do que o relatado por Liu et al. (2020) (0,92 a 4,7%), Li et al. (2022) (2,66%), Li et al. (2023) (1,92%) usando outros métodos de extração. Em relação aos polifenóis, também foram verificadas pequenas quantidades ( $1,76 \pm 0,00$  mg GAE/g de fucoidano) nas amostras, valor próximo ao de Li et al. (2023) (1,40 mg GAE/g de alga), porém maior quando comparado ao teor de polifenóis obtidos por Fauziee et al. (2021) ( $0,61 \pm 0,30$  mg GAE/g) e Lim et al. (2014) ( $0,0369 \pm 0,15$  mg EAG/g) para fucoidano extraído de algas do gênero *Sargassum*. Assim, níveis reduzidos de proteínas e compostos fenólicos evidenciam a eficácia do pré-tratamento na remoção desses compostos, promovendo uma relativa pureza ao fucoidano.

A composição de monossacarídeos do fucoidano indica quais as atividades biológicas o polissacarídeo pode exibir (Wang et al. 2024). Os resultados obtidos para a alga *Sargassum cymosum* C. Agardh demonstram que os açúcares neutros constituíam a maior parte da estrutura (fucose, galactose, glicose, xilose, manose, ramnose e arabinose) (74,44%) do fucoidano, com algumas frações ácidas compostas por ácidos urônicos (ácido glucurônico e ácido galacturônico) (25,56%). Especificamente, observou-se que esse polissacarídeo era composto por quantidades maiores de fucose (19,31%  $\pm$  1,85), galactose (19,17%  $\pm$  0,62), glicose (20,94%  $\pm$  2,52) e ácido glucurônico (24,54%  $\pm$  1,53), e porções menores de manose (9,87%  $\pm$  0,64), arabinose (0,26%  $\pm$  0,04), ramnose (0,59%  $\pm$  0,04), xilose (4,30%  $\pm$  0,58) e ácido galacturônico (1,01%  $\pm$  0,42), mostrando uma estrutura complexa.

Em outros estudos com extração por ultrassom, a fucose foi o principal monossacarídeo com quantidades superiores a 30% (Wang et al. 2021; Bagale et al. 2023; Hans et al. 2023; Alboofetileh et al. 2019) com diferentes proporções de outros monossacarídeos. Em nosso estudo, a intensidade da potência ultrassônica e o tempo aplicado foram superiores aos de outros estudos, o que pode ter causado o teor moderado de fucose. A galactose, identificada como o segundo monossacarídeo mais abundante no fucoidano, foi consistentemente relatada em vários estudos (Alboofetileh et al. 2019; Hans et al. 2023; Li et al. 2023; Wang et al. 2021). Extrações assistidas por ultrassom revelaram um teor de galactose variando de 18 a 25% (Alboofetileh et al. 2019; Hans et al. 2023; Wang et al. 2021). Os resultados obtidos para galactose estão alinhados com essas proporções relatadas, reforçando a consistência observada em diferentes estudos.

Em relação à glicose, Hans et al. (2023) relataram uma proporção inferior (3,09%  $\pm$  0,15), em contraste com os resultados deste estudo. Notavelmente, Wang et al. (2021) relataram um aumento do teor de glicose (13,3%) sob potência ultrassônica elevada (100 W). Em nosso estudo, a aplicação de 240 W de potência ultrassônica também resultou em um aumento no teor de glicose, potencialmente atribuído à degradação da celulose, levando a um maior conteúdo desse monossacarídeo no fucoidano.

Assim como a glicose, o ácido glucurônico é identificado em proporções menores, conforme relatado por Hans et al. (2023) (2%), diferindo dos nossos resultados. No entanto, Balboa et al. (2013) e Ale et al. (2012) observaram que períodos prolongados

de extração estão correlacionados com maiores rendimentos de fucoidano e aumento do ácido glucurônico, porém com menores teores de fucose. Araújo (2018) observou que fucoidanos com menor massa molecular exibiam maior conteúdo deste ácido urônico. Essas observações podem esclarecer a presença moderada de fucose e o elevado teor de ácido glucurônico verificados neste estudo.

A composição e proporção de monossacarídeos são importantes para as atividades biológicas (Wang et al. 2024). Neste estudo, fucoidano apresentou maiores teores de fucose, galactose, glicose e ácido glucurônico. De acordo com a literatura, atividades antioxidantes e anti-inflamatórias estão associadas ao teor de fucose e galactose (Wang et al. 2024), e glicose, galactose, xilose e ácido glucurônico estão associados a ação prebiótica (Xie e Cheong, 2022), pois, podem influenciar positivamente a microbiota intestinal estimulando o crescimento de bactérias probióticas (Xie & Cheong, 2022), sugerindo que o fucoidano extraído poderia apresentar essas atividades biológicas potenciais.

A massa molecular do fucoidano (Mw) também desempenha um papel crucial na atividade biológica e na aplicação terapêutica (Apostolova et al., 2020). Fucoidanos de baixa massa molecular (LMWF) tendem a exibir atividades biológicas superiores em comparação aos fucoidanos de alta massa molecular (HMWF) (Apostolova et al., 2020; Luthuli et al., 2019). O Mw do fucoidano, normalmente varia entre 1 a 1600 kDa, sendo influenciado por condições ambientais, biologia das macroalgas, temporada de colheita e processo de extração e purificação (Flórez-Fernández et al., 2018). Neste estudo, o uso do ultrassom e ácido cítrico produziu um fucoidano de baixa massa molecular (8 kDa). Esses resultados estão em consonância com Bagale et al. (2023), que também identificaram a redução na massa molecular ao empregar ultrassom (102,5 W/cm<sup>2</sup> por 40 minutos), diminuindo o Mw de 815 kDa para 318 kDa. Adicionalmente, Flórez-Fernández et al. (2017) observaram uma diminuição na massa molecular (de 50 para 25 kDa) ao utilizarem banho ultrassônico (150 W) em diferentes períodos (5-30 minutos). Fawzy & Goma (2021) verificaram efeito positivo na redução na massa molecular (0,86 a 15,63 kDa) com o aumento da concentração de ácido cítrico (1 a 3%) na etapa ácida. Desta forma, os resultados obtidos estão alinhados com os estudos citados acima, evidenciando que a aplicação de ultrassom e ácido cítrico efetivamente reduz o Mw do fucoidano. Portanto, a moderação na potência e período de aplicação do ultrassom e uso do ácido cítrico pode ser uma

estratégia interessante para preservar as características físicas, estruturais e atividades biológicas do fucoidano (Flórez-Fernandes et al. 2017).

### 3.5. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do fucoidano pode ser influenciada pela composição de monossacarídeos e massa molecular (El Rashed et al. 2021). A relação entre massa molecular e atividade antioxidante não está totalmente estabelecida. Alguns estudos relatam alta atividade antioxidante para fucoidanos de baixa massa molecular (LMWF) (Yu et al., 2021; Chen et al., 2021) enquanto em outro foi observado baixa atividade antioxidante para LMWF (Lahrsen, Liewert & Alban, 2018). Portanto, devido a essa indefinição do comportamento e para uma melhor comparação, a atividade antioxidante do LMWF obtido no presente estudo foi avaliada utilizando os três principais ensaios: poder antioxidante redutor férrico (FRAP), ABTS e DPPH.

O ensaio FRAP consiste na capacidade antioxidante do fucoidano de reduzir o complexo TPTZ-Fe (III) para o complexo TPTZ-Fe (II) por meio de transferência de elétrons. O resultado deste estudo ( $0,86 \pm 0,004$  mg TE  $g^{-1}$ ) foi inferior em comparação com o fucoidano comercial ( $13,9 \pm 0,8$  mg TE  $g^{-1}$ ) e a fração purificada ( $14,5 \pm 0,3$  mg TE  $g^{-1}$ ) relatados por Rajauria et al. (2023). Os estudos de Zhong et al (2020) e Baek et al. (2021) reportaram uma relação entre os polifenóis e a capacidade antioxidante usando este método de quantificação em diferentes espécies de *Sargassum*, sugerindo que os polifenóis são os principais contribuintes da atividade antioxidante por este método. Neste estudo, os polifenóis foram retirados no pré-tratamento para manter a pureza do fucoidano e não ter uma superestimação dos valores de atividade antioxidante. Portanto, os valores de FRAP foram abaixo do encontrado na literatura, sugerindo que sucessivas etapas de purificação podem resultar em uma diminuição nos valores de FRAP como verificado por Rajauria et al. (2023). Além disso, grupos sulfato são responsáveis por terem a capacidade de doar elétrons e de acordo com Araújo, (2018) a posição deste grupo sulfato ao longo da molécula também desempenha um papel crucial na atividade antioxidante, pois estes grupos podem estar em localizações que dificultem ou impossibilitem a interação entre eles e a molécula alvo. Portanto, os resultados obtidos indicam que a purificação e localização dos grupos sulfatos podem estar relacionados ao baixo valor de FRAP.

A atividade antioxidante também foi investigada através do ensaio ABTS, que é baseado na doação de elétrons e pode refletir os níveis de antioxidante de

compostos hidrofílicos e lipofílicos, sendo mais sensível do que o sequestro do radical DPPH (Fagundo-Mollineda et al. 2023). Os resultados obtidos ( $22,1 \pm 0,005 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) ficaram na faixa entre os estudos de El Rashed et al. (2021) ( $39 \pm 3,7 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) que extraiu fucoidano de *Cystoseira compressa* usando solução de ácido clorídrico (pH 2) a 60 °C por 3 horas e do estudo de Roberto et al. (2024) ( $14,3 \pm 0,5 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) usando extração com água quente.

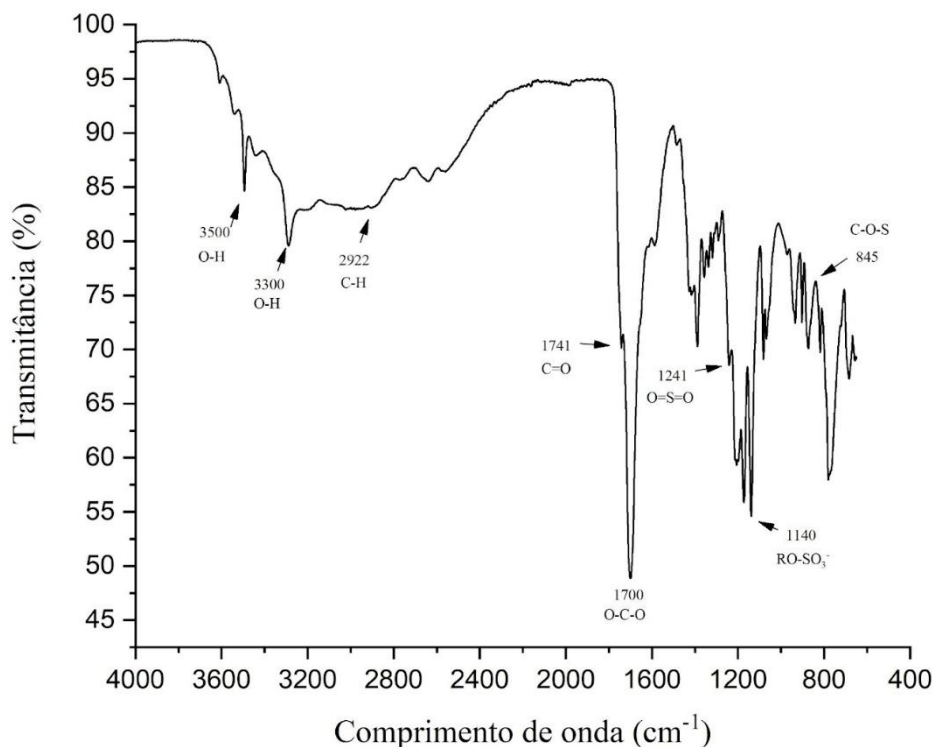
Por fim, o ensaio DPPH foi utilizado para avaliar a atividade de eliminação de radicais livres, demonstrando a capacidade do fucoidano em doar um átomo de hidrogênio (Hans et al. 2023). Os resultados ( $3,4 \text{ mmol TE} / 100 \text{ g}^{-1}$ ) foram inferiores aos relatados por Guo et al. (2014) (14 a 26 mmol TE/ 100 g<sup>-1</sup>), os quais variaram a intensidade e duração de aplicação do ultrassom, resultando em uma ampla faixa de massas moleculares (350 a 91 kDa) de fucoidano. Esses mesmos autores observaram a redução na atividade antioxidante com a diminuição da massa molecular, indicando a possível destruição de grupos químicos, como sulfato, durante o processo de extração com ultrassom, possivelmente induzida pelos radicais livres que atacam a fucose não sulfatada da estrutura. Além disso, a atividade de eliminação de radicais livres do DPPH pode ser afetada negativamente por ácidos urônicos (Wang et al. 2024; Li et al. 2016). Essa afirmação foi corroborada por Liu et al. (2011), que avaliou a atividade antioxidante somente do ácido glucurônico e observaram nenhuma atividade antioxidante deste ácido urônico. A partir dessa observação, sugere-se que o elevado teor de ácido glucurônico pode ter afetado a atividade antioxidante. Adicionalmente, o estudo de Gulcin (2020) sugere que moléculas antioxidantes como fucoidano não inativam os radicais DPPH devido ao impedimento estérico representado pela estrutura química que envolve o radical, portanto, a capacidade antioxidante total pode ser subestimada. Além disso, o DPPH é uma molécula hidrofóbica e sua relação deve ser realizada em solventes orgânicos (Fagundo-Mollineda et al. 2023). Portanto, o uso de etanol e água durante o processo de extração pode ter causado interferência na transferência de elétron ou doação de próton durante a reação.

As avaliações pelas 3 metodologias (FRAP, ABTS e DPPH) forneceram uma visão geral da capacidade antioxidante do fucoidano extraído neste estudo. Os resultados apontaram que o fucoidano extraído exibiu atividade antioxidante quando utilizado o método do radical ABTS, porém atividades antioxidantes pouco

expressivas quando utilizados os outros métodos de quantificação, que podem ter sido afetados por fatores como método de extração, purificação, solventes utilizados e também a composição química e estrutural da molécula.

### **3.6. Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR)**

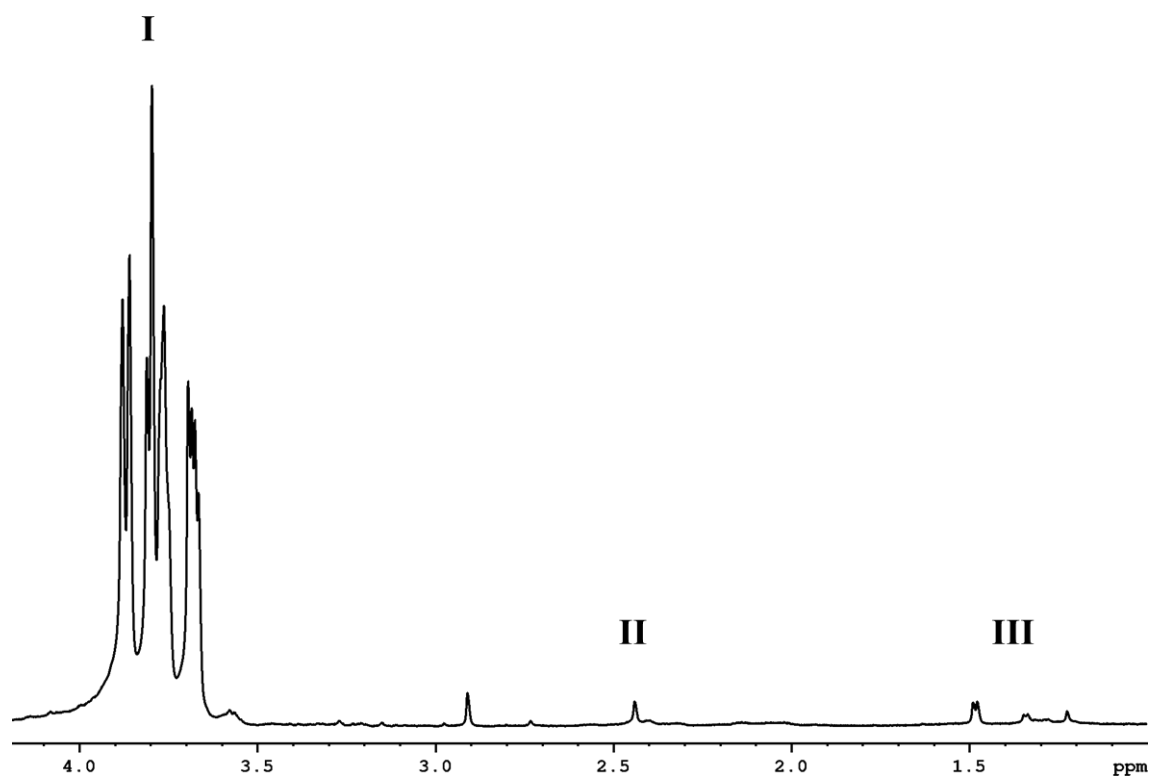
A análise MIR-ATR fornece evidências da presença de grupos funcionais na estrutura de uma molécula, usado para identificação ou investigação de sua composição química (Fernando et al. 2017). Assim, a Figura 2 ilustra a análise realizada no fucoídano extraído neste estudo. O sinal entre 3500-3300  $\text{cm}^{-1}$  confirma a existência da vibração de estiramento da hidroxila (-OH) existente na estrutura da amostra (Keshk et al., 2023). O sinal fraco em 2922  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento assimétrico de C-H (Kothai et al., 2023). O pico verificado por volta de 1741  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da carbonila (C=O) do éster carboxílico (Fauziee et al., 2021). Outro pico foi verificado por volta de 1700  $\text{cm}^{-1}$ , atribuído ao estiramento da carboxilato, provavelmente relacionadas aos ácidos urônicos presentes no fucoídano (Fauziee et al., 2021), conforme observado na composição de monossacarídeos. O pico localizado na banda 1140  $\text{cm}^{-1}$  foi identificado como a vibração assimétrica do grupo éter de sulfato. A vibração assimétrica de estiramento dos ésteres sulfato (O=S=O) foi identificada entre as bandas de 1230-1260  $\text{cm}^{-1}$  (Koh, Lu & Zhou, 2019) e o pico em torno de 830-850  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração C-O-S dos grupos sulfato. Esses picos são regiões de identificação ou componentes característicos do fucoídano, e a determinação desses picos confirma que o material extraído continha grupos sulfato (Alboofetileh et al., 2019; Hanjabam et al., 2019).



**Figura 2.** Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR) do fucoidano de *Sargassum cymosum* C. Agardh na condição otimizada

### 3.7. Ressonância magnética nuclear (<sup>1</sup>H NMR)

Análise de ressonância magnética nuclear proporciona o acesso a diferentes tipos de prótons presentes na molécula de fucoidano, revelando suas características estruturais (Hans et al., 2023). Portanto, a composição estrutural do fucoidano está demonstrada na Figura 3. O espectro do fucoidano na condição otimizada exibe a presença de diferentes grupos de fucose com alterações nas posições glicosídicas e variáveis padrões de monossacarídeos (pico I); os grupos associados ao -OH em 2,4 ppm (pico II); e os grupos metil da unidade de L-fucose entre 1,20 a 1,50 ppm (pico III) que sugerem ligações alternadas do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) dos resíduos de fucose ligados aos sulfatos, sendo este pico pouco pronunciado, que indica um conteúdo de sulfato moderado. A integração destes sinais e o espectro confirma a extração do fucoidano.



**Figura 3.** Espectro  $^1\text{H}$  NMR do fucoidano extraído de *Sargassum cymosum* C. Agardh na condição otimizada, em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $60^\circ\text{C}$

#### 4. Conclusão

O método de extração escolhido, isolamento assistido por ultrassom e substituição de HCl por ácido cítrico na etapa ácida, foi eficaz para extração de fucoidano. Além disso, o Design Experimental Box-Behnken também provou ser uma ferramenta eficaz para encontrar a condição de rendimento otimizado na extração de fucoidano da espécie *Sargassum cymosum* C. Agardh. As condições otimizadas foram: 27 mL de solvente/ 1 g de alga, 11 min e 240 W de potência com rendimento de  $17,12\% \pm 0,24$ . A potência ultrassônica exerceu a maior influência positiva no rendimento. O fucoidano na condição otimizada apresentou moderado teor de sulfato ( $24,5\% \pm 0,003$ ) e baixos teores de contaminantes (proteínas e polifenóis). A estrutura do fucoidano é composta predominantemente por fucose, galactose, glicose e ácido

glicurônico, além de pequenas quantidades de xilose, ramnose, arabinose, manose e ácido galacturônico, com baixa massa molecular (8 kDa). A presença de ésteres de sulfato e fucose na estrutura do polissacarídeo foi confirmada utilizando espectros MIR-ATR e <sup>1</sup>H RMN. O fucoidano exibiu atividade antioxidante no ensaio ABTS (22,1±0,005 µmol TE g<sup>-1</sup>), mas baixa atividade antioxidante nos ensaios DPPH e FRAP, atribuída à remoção de compostos fenólicos e proteínas durante o pré-tratamento e a altos níveis de ácido glucurônico. Finalmente, estes resultados contribuem significativamente para a literatura cada vez maior sobre o fucoidano de espécies de *Sargassum*, mas também oferecem orientações valiosas para futuras investigações como prebiótico e anti-inflamatório.

## 5. Referências

- Alboofetileh, M., Rezaei, M., Tabarsa, M., & You, S. (2019). Ultrasound-assisted extraction of sulfated polysaccharide from *Nizamuddinia zanardinii*: Process optimization, structural characterization, and biological properties. *Journal of Food Process Engineering*, 42, Article e12979. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12979>
- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2012). Designed optimization of a single-step extraction of fucose-containing sulfated polysaccharides from *Sargassum* sp. *Journal of applied phycology*, 24, 715-723. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9690-3>
- Anisha, G. S., Padmakumari, S., Patel, A. K., Pandey, A., & Singhania, R. R. (2022). Fucoidan from marine macroalgae: Biological actions and applications in regenerative medicine, drug delivery systems and food industry. *Bioengineering*, 9, 472. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9090472>
- Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, I., ... & Kokova, V. (2020). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. *Polymers*, 12(10), 2338. <https://doi.org/10.3390/polym12102338>
- Araújo, Thiago Laurentino. Fucanas extraídas da alga *Dictyota menstrualis* com atividade antioxidante, antiproliferativa e anticoagulante. 2018. Dissertação de Mestrado.
- Baek, S. H., Cao, L., Jeong, S. J., Kim, H. R., Nam, T. J., & Lee, S. G. (2021). The comparison of total phenolics, total antioxidant, and anti-tyrosinase activities of Korean *Sargassum* species. *Journal of Food Quality*, 2021, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2021/6640789>
- Bagale, U., Kadi, A., Malinin, A., Anjum, V., Potoroko, I., & Sonawane, S. H. (2023). Impact of a Sonochemical Approach to the Structural and Antioxidant Activity of Brown Algae (Fucoidan) Using the Box–Behnken Design Method. *Processes*, 11(7), 1884. <https://doi.org/10.3390/pr11071884>

- Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., & Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1764-1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Borges, P. R. S., Tavares, E. G., Guimarães, I. C., de Paulo Rocha, R., Araujo, A. B. S., Nunes, E. E., & Boas, E. V. D. B. V. (2016). Obtaining a protocol for extraction of phenolics from açai fruit pulp through Plackett–Burman design and response surface methodology. *Food chemistry*, 210, 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.077>
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976). *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, C. Y., Wang, S. H., Huang, C. Y., Dong, C. D., Huang, C. Y., Chang, C. C., & Chang, J. S. (2021). Effect of molecular mass and sulfate content of fucoidan from *Sargassum siliquosum* on antioxidant, anti-lipogenesis, and anti-inflammatory activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(4), 359-364. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.06.005>
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Dische, Z., & Shettles, L. B. (1948). A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micro method for their determination. *Journal of Biological Chemistry*, 175, 595-603.
- Dodgson, K. S., & Price, R. G. (1962). A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*, 84, 106. <https://doi.org/10.1042/bj0840106>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El Rashed, Z., Lupidi, G., Grasselli, E., Canesi, L., Khalifeh, H., & Demori, I. (2021). Antioxidant and antisteatotic activities of fucoidan fractions from marine and terrestrial sources. *Molecules*, 26, 4467. <https://doi.org/10.3390/molecules26154467>

Fagundo-Mollineda, A., Robledo, D., Vásquez-Elizondo, R. M., & Freile-Pelegrián, Y. (2023). Antioxidant activities in holopelagic *Sargassum* species from the Mexican Caribbean: Temporal changes and intra-thallus variation. *Algal Research*, 76, 103289. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103289>

Fauziee, N. A. M., Chang, L. S., Mustapha, W. A. W., Nor, A. R. M., & Lim, S. J. (2021). Functional polysaccharides of fucoidan, laminaran and alginate from Malaysian brown seaweeds (*Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornata* and *Padina boryana*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1135-1145. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.067>

Fawzy, M. A., & Gomaa, M. (2021). Optimization of citric acid treatment for the sequential extraction of fucoidan and alginate from *Sargassum latifolium* and their potential antioxidant and Fe (III) chelation properties. *Journal of Applied Phycology*, 33, 2523-2535. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02453-9>

Fawzy, M. A., & Gomaa, M. (2021). Optimization of citric acid treatment for the sequential extraction of fucoidan and alginate from *Sargassum latifolium* and their potential antioxidant and Fe (III) chelation properties. *Journal of Applied Phycology*, 33, 2523-2535. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02453-9>

Fernando, I. P., Sanjeewa, K. K. A., Samarakoon, W., Lee, W. W., Kim, H. S., Kim, E. A., ... & Jeon, Y. J. (2017). FTIR characterization and antioxidant activity of water-soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.12.1>

Flórez-Fernández, N., Domínguez, H., & Torres, M. D. (2019). A green approach for alginate extraction from *Sargassum muticum* brown seaweed using ultrasound-assisted technique. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 451-459. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.232>

Flórez-Fernández, N., López-García, M., González-Muñoz, M. J., Vilariño, J. M. L., & Domínguez, H. (2017). Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum*. *Journal of Applied Phycology*, 29, 1553-1561. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1043-9>

Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., González-Muñoz, M. J., & Domínguez, H. (2018). Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan. *Algal research*, 30, 128-148. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.002>

Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., González-Muñoz, M. J., & Domínguez, H. (2018). Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan. *Algal research*, 30, 128-148. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.002>

Flórez-Fernández, N., Vaamonde-García, C., Torres, M. D., Buján, M., Muñíos, A., Muiños, A., ... & Domínguez, H. (2023). Relevance of the extraction stage on the anti-inflammatory action of fucoidans. *Pharmaceutics*, 15, 808. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030808>

Gulcin, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* 94, 651–715 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Guo, X., Ye, X., Sun, Y., Wu, D., Wu, N., Hu, Y., & Chen, S. (2014). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure, and antioxidant activity of sea cucumber fucoidan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1088-1095. <https://doi.org/10.1021/jf404717y>

Hanjabam, M. D., Kumar, A., Tejpal, C. S., Krishnamoorthy, E., Kishore, P., & Kumar, K. A. (2019). Isolation of crude fucoidan from *Sargassum wightii* using conventional and ultra-sonication extraction methods. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber*, 20, Article 100200. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100200>

Hans, N., Pattnaik, F., Malik, A., & Naik, S. (2023). Comparison of different green extraction techniques and their influence on chemical characteristics of sulfated polysaccharide (fucoidan) from *Padina tetrastromatica* and *Turbinaria conoides*. *Algal Research*, 74, Article 103199. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103199>

Hifney, A. F., Fawzy, M. A., Abdel-Gawad, K. M., & Gomaa, M. (2016). Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum sp.* and its potential antioxidant and emulsifying activities. *Food Hydrocolloids*, 54, 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.022>

Huang, C. Y., Hong, Y. H., Tsai, Y. H., Li, W. P., Chiu, Y. C., Chang, J. S., ... & Patel, A. K. (2023). Ameliorating effects of crude fucoidan extracts from *Sargassum spp.* obtained from Penghu Islands, Taiwan. <https://doi.org/10.56042/ijeb.v61i10.1794>

January, G. G., Naidoo, R. K., Kirby-McCullough, B., & Bauer, R. (2019). Assessing methodologies for fucoidan extraction from South African brown algae. *Algal Research*, 40, Article 101517. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101517>

Keshk, A. A., Elsayed, N. H., Almutairi, F. M., Al-Anazi, M., Said, S., Althurwi, H. M., ... & El-Aassar, M. R. (2023). Effect of green and sustainable extracted fucoidan polysaccharide as a corrosion inhibitor in 3.5% NaCl. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03579-7>

Koh, H. S. A., Lu, J., & Zhou, W. (2019). Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand. *Carbohydrate polymers*, 212, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.040>

Kothai, R., Arul, B., & Anbazhagan, V. (2023). Anti-dengue activity of ZnO nanoparticles of crude fucoidan from brown seaweed *S. marginatum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195, 3747-3763. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03966-w>

Laeliocattleya, R. A., Yunianta, Y., Risjani, Y., & Wulan, S. N. (2023). Characterization of 'novel fucoidan' extracted from brown seaweed (*Sargassum echinocarpum* J. Ag.) using Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) and its potential antioxidant activity. *Natural Product Research*, 1-13. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2282111>

Lahrsen, E., Liewert, I., & Alban, S. (2018). Gradual degradation of fucoidan from *Fucus vesiculosus* and its effect on structure, antioxidant and antiproliferative activities. *Carbohydrate polymers*, 192, 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.056>

Lakshmanan, A., Balasubramanian, B., Maluventhen, V., Malaisamy, A., Baskaran, R., Liu, W. C., & Arumugam, M. (2022). Extraction and Characterization of Fucoïdan Derived from *Sargassum ilicifolium* and Its Biomedical Potential with In Silico Molecular Docking. *Applied Sciences*, 12, Article 13010. <https://doi.org/10.3390/app122413010>

Li, R., Zhou, Q. L., Chen, S. T., Tai, M. R., Cai, H. Y., Ding, R., ... & Zhong, S. Y. (2022). Chemical characterization and immunomodulatory activity of fucoïdan from *Sargassum hemiphyllum*. *Marine drugs*, 21(1), 18. <https://doi.org/10.3390/md21010018>

Li, R., Zhou, Q. L., Yang, R. Y., Chen, S. T., Ding, R., Liu, X. F., ... & Williams, R. J. (2023). Determining the potent immunostimulation potential arising from the heteropolysaccharide structure of a novel fucoïdan, derived from *Sargassum Zhangii*. *Food Chemistry: X*, 18, Article 100712. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100712>

Li, Z., Nie, K., Wang, Z., & Luo, D. (2016). Quantitative structure activity relationship models for the antioxidant activity of polysaccharides. *PLoS One*, 11(9), e0163536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163536>

Lim, S. J., Aida, W. M. W., Maskat, M. Y., Mamot, S., Ropien, J., & Mohd, D. M. (2014). Isolation and antioxidant capacity of fucoïdan from selected Malaysian seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 42, 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.007>

Liu, J., Wu, S. Y., Chen, L., Li, Q. J., Shen, Y. Z., Jin, L., ... & Tong, H. B. (2020). Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoïdans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1385-1392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.113>

Liu, Y. H., Liang, W. L., Lee, C. C., Tsai, Y. F., & Hou, W. C. (2011). Antioxidant and semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibitory activities of glucuronic acid hydroxamate. *Food Chemistry*, 129(2), 423-428. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.094>

Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., & Tong, H. (2019). Therapeutic effects of fucoïdan: A review on recent studies. *Marine drugs*, 17(9), 487. <https://doi.org/10.3390/md17090487>

Mabate, B., Daub, C. D., Pletschke, B. I., & Edkins, A. L. (2023). Comparative Analyses of Fucoïdans from South African Brown Seaweeds: That Inhibit Adhesion, Migration, and Long-Term Survival of Colorectal Cancer Cells. *Marine Drugs*, 21, 203. <https://doi.org/10.3390/md21040203>

Mapholi, Z., & Goosen, N. J. (2023). Optimization of fucoïdan recovery by ultrasound-assisted enzymatic extraction from South African kelp, *Ecklonia maxima*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, Article 106710. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106710>

Mensah, E. O., Kanwugu, O. N., Panda, P. K., & Adadi, P. (2023). Marine fucoïdans: Structural, extraction, biological activities and their applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, Article 108784. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108784>

Nogueira, M. T., Chica, L. R., Yamashita, C., Nunes, N. S. S., Moraes, I. C. F., Branco, C. C. Z., & Branco, I. G. (2022). Optimal conditions for alkaline treatment of alginate extraction from the brown seaweed *Sargassum cymosum* C. Agardh by response surface methodology. *Applied Food Research*, 2, Article 100141. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100141>

Prado, S. B. D., Melfi, P. R., Castro-Alves, V. C., Broetto, S. G., Araújo, E. S., Nascimento, J. R. D., & Fabi, J. P. (2016). Physiological degradation of pectin in papaya cell walls: release of long chains galacturonans derived from insoluble fractions during postharvest fruit ripening. *Frontiers in plant science*, 7, Article 1120. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01120>

Prado, S. B. R. D., Ferreira, G. F., Harazono, Y., Shiga, T. M., Raz, A., Carpita, N. C., & Fabi, J. P. (2017). Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. *Scientific reports*, 7, Article 16564. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16709-3>

Rajauria, G., Ravindran, R., Garcia-Vaquero, M., Rai, D. K., Sweeney, T., & O'Doherty, J. (2023). Purification and Molecular Characterization of Fucoidan Isolated from *Ascophyllum nodosum* Brown Seaweed Grown in Ireland. *Marine Drugs*, 21, Article 315. <https://doi.org/10.3390/md21050315>

Roberto T, A. D., Virginia, C. A., Ángeles, A. A. M., Casimiro, C. G., Claudia, P. M., Eduardo, U., ... & Sergey, D. (2024). Antitumor and antioxidant activities of polysaccharides from the seaweed *Durvillaea antarctica*. *Chemical Biology & Drug Design*, 103(1), e14392. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14392>

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996–1002. <https://10.1016/j.foodchem.2010.01.037>

Saravana, P. S., Cho, Y. N., Woo, H. C., & Chun, B. S. (2018). Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis. *Journal of Cleaner Production*, 198, 1474-1484. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.151>

Shiga, T. M., Cordenunsi, B. R., & Lajolo, F. M. (2009). Effect of cooking on non-starch polysaccharides of hard-to-cook beans. *Carbohydrate Polymers*, 76, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.035> Shiga, T. M., Cordenunsi, B. R., & Lajolo, F. M. (2009). Effect of cooking on non-starch polysaccharides of hard-to-cook beans. *Carbohydrate Polymers*, 76, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.035>

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158. <https://10.5344/ajev.1965.16.3.144>

Tan, J., Song, Y., Wang, J., Wu, N., Yue, Y., & Zhang, Q. (2023). Pharmacokinetics of fucoidan and low molecular weight fucoidan from *Saccharina japonica* after oral

administration to mice. *Journal of Oceanology and Limnology*, 41(5), 1900-1909. <https://doi.org/10.1007/s00343-022-2225-8>

Thao My, P. L., Sung, V. V., Dat, T. D., Nam, H. M., Phong, M. T., & Hieu, N. H. (2020). Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from Vietnamese brown Seaweed *Sargassum mcclurei* and testing bioactivities of the extract. *ChemistrySelect*, 5, 4371-4380. <https://doi.org/10.1002/slct.201903818>

Tsou, M. H., Lee, C. C., Wu, Z. Y., Lee, Z. H., & Lin, H. M. (2022). Bioactivity of crude fucoidan extracted from *Sargassum*

*ilicifolium* (Turner) C. Agardh. *Scientific Reports*, 12(1), 15916. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19370-7>

Wan, P., Yang, X., Cai, B., Chen, H., Sun, H., Chen, D., & Pan, J. (2015). Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Laminaria japonica* and their antioxidative and glycosidase inhibitory activities. *Journal of Ocean University of China*, 14, 651-662. <https://doi.org/10.1007/s11802-015-2648-3>

Wang, C. Y., & Chen, Y. C. (2016). Extraction and characterization of fucoidan from six brown macroalgae. *Journal of Marine Science and Technology*, 24, 319-328. <https://doi.org/10.6119/JMST-015-0521-3>

Wang, S. H., Huang, C. Y., Chen, C. Y., Chang, C. C., Huang, C. Y., Dong, C. D., & Chang, J. S. (2021). Isolation and purification of brown algae fucoidan from *Sargassum siliquosum* and the analysis of anti-lipogenesis activity. *Biochemical Engineering Journal*, 165, Article 107798. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107798>

Wang, Y., Tan, C., Davachi, S. M., Li, P., Davidowsky, P., & Yan, B. (2021). Development of microcapsules using chitosan and alginate via W/O emulsion for the protection of hydrophilic compounds by comparing with hydrogel beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.089>

Wang, Z., Zheng, Y., Lai, Z., Hu, X., Wang, L., Wang, X., ... & Li, N. (2024). Effect of monosaccharide composition and proportion on the bioactivity of polysaccharides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127955. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127955>

Xie, X. T., & Cheong, K. L. (2022). Recent advances in marine algae oligosaccharides: Structure, analysis, and potential prebiotic activities. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(28), 7703-7717. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916736>

Yu, J., Li, Q., Wu, J., Yang, X., Yang, S., Zhu, W., ... & Lu, J. (2021). Fucoidan Extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida* Grown in Weihai, China—Chemical Composition and Comparison of Antioxidant Activity of Different Molecular Weight Fractions. *Frontiers in Nutrition*, 8, Article 636930. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.636930>

Zayed, A., Finkelmeier, D., Hahn, T., Rebers, L., Shanmugam, A., Burger-Kentischer, A., & Ulber, R. (2023). Characterization and cytotoxic activity of microwave-assisted

extracted crude fucoidans from different brown seaweeds. *Marine Drugs*, 21, 48. <https://doi.org/10.3390/md21010048>

Zhong, B., Robinson, N. A., Warner, R. D., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. (2020). LC-ESI-QTOF-MS/MS characterization of seaweed phenolics and their antioxidant potential. *Marine Drugs*, 18(6), 331. <https://doi.org/10.3390/md18060331>

Zhu, C. P., Zhai, X. C., Li, L. Q., Wu, X. X., & Li B. (2015). Response surface optimization of ultrasound-assisted polysaccharides extraction from pomegranate peel. *Food Chemistry*, 177, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.022>

**Capítulo 2 – Formulação de matriz polimérica com fucoidano, ágar e alginato de sódio com potencial aplicação em impressão 3D: Caracterização e printabilidade<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Este capítulo foi formatado de acordo com a revista Carbohydrate Polymers (ISSN: 0144-8617)

## Resumo

Fucoidan (FU), extraído de *Sargassum cymosum* C. Agardh, alginato de sódio (SA) e ágar (AG) foram utilizados para formar um hidrogel estável através de gelificação térmica com potencial aplicação em impressão 3D. As formulações propostas (1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA) foram caracterizadas por análises físicas (reologia, potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade (PDI)), química (pH) e análises estruturais (Espectroscopia no Infravermelho Médio de Refletância Total Atenuada (ATR-MIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)). As matrizes poliméricas foram avaliadas para testes de filamentos e posteriormente foram impressos os modelos 3D (cubos), avaliados quanto à precisão de impressão, estabilidade e textura. A formulação 1%FU 2%SA 2%SA apresentou ótimos resultados para potencial zeta ( $-25,5 \pm 2,47$  mV), diâmetro de partícula ( $3,703 \pm 22,62$   $\mu$ m) e PDI ( $0,483 \pm 0,11$ ). Todas as formulações exibiram comportamento pseudoplástico ( $n < 1$ ), com temperaturas de gelificação em torno de 30-35 °C e boa estabilidade. A maior taxa de recuperação foi de 79,6% (1% 2%AG e 2%SA). A análise ATR-MIR revelou melhores interações entre cadeias carboxílicas, grupos sulfato e radicais hidroxila na formulação 1% 2% AG e 2% SA. A análise MEV mostrou morfologia lamelar, com maior formação de poros com maiores concentrações de alginato ou ágar. A formulação 1%FU 2%SA 2%AG obteve a melhor printabilidade no teste de filamento, portanto, foi utilizada para imprimir os modelos 3D, que apresentaram excelente precisão, estabilidade e textura lisa. Conclui-se que a escolha dos polissacarídeos foi adequada para o desenvolvimento de hidrogéis e sua potencial aplicação em diversos setores.

**Palavras-chave:** Reologia. Polissacarídeos algais. Textura. Impressão 3D

**Abstract**

Fucoidan (FU), extracted from *Sargassum cymosum* C. Agardh, sodium alginate (SA) and agar (AG) were used to form a stable hydrogel through thermal gelation with potential application in 3D printing. The proposed formulations (1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA, and 1%FU 3%AG 1%SA) were characterized by physical analyses (rheology, zeta potential, particle diameter, and polydispersity index (PDI)), chemical (pH) and structural analyses (Attenuated Total Reflectance Mid-Infrared Spectroscopy (ATR-MIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM)). The polymer matrices were evaluated for filament tests and subsequently the 3D models (cubes) were printed, which were assessed for printing accuracy, stability, and texture. The formulation 1%FU 2%SA 2%SA showed great results for zeta potential ( $-25.5 \pm 2.47$  mV), particle diameter ( $3.703 \pm 22.62$   $\mu\text{m}$ ), and PDI ( $0.483 \pm 0.11$ ). All formulations exhibited pseudoplastic behavior ( $n < 1$ ), with a gelling temperatures of around 30-35 °C and good stability. The highest recovery rate was 79.6% (1% 2%AG and 2%SA). ATR-MIR analysis revealed better interactions between carboxylic chains, sulfate groups, and hydroxyl radicals in the 1% 2%AG and 2%SA formulation. SEM analysis showed lamellar morphology, with increased formation of pores with higher concentrations of alginate or agar. The formulation 1%FU 2%SA 2%AG achieved the best printability in filament test, therefore, was used to print the 3D models, which exhibited excellent precision, stability, and smooth texture. It is concluded that the choice of polysaccharides was appropriate for the development of hydrogels and their potential application in various sectors.

**Keywords:** Rheology. Algal polysaccharides. Texture. 3D Printing.

## 1. Introdução

Hidrogéis são redes tridimensionais insolúveis capazes de absorver e reter elevada quantidade de água (Bahram, Mohseni & Moghtader, 2016; Reys et al., 2023), são considerados dispositivos promissores para uma ampla gama de aplicações incluindo engenharia tecidual, encapsulação de células, curativos para feridas, liberação controlada de medicamentos, embalagens alimentícias (ativas e inteligentes), revestimentos e filmes comestíveis, bem como agentes antimicrobianos para eliminar contaminantes alimentares (Sudheer, Bandyopadhyay & Bhat, 2023).

Dentre as metodologias de elaboração destas matrizes destaca-se os hidrogéis responsivos, que têm a capacidade de responder a estímulos ambientais específicos (pH, temperatura e força iônica). A resposta do hidrogel a estes estímulos muitas vezes envolve mudança no seu volume, forma ou na liberação de substâncias encapsuladas (Leyva-Jiménez et al., 2023).

Hidrogéis responsivos a estímulos têm ganhado bastante atenção em diversos campos da ciência, especialmente as matrizes formadas por gelificação térmica, que é definida como o processo de transição do estado fluido para gel com a variação de temperatura (Niemczyk-Soczynska et al., 2022). Durante essa transição, as moléculas poliméricas se rearranjam de uma configuração aleatória para uma hélice, agrupando-se em aglomerados interconectados pelas regiões não torcidas à medida que a temperatura se altera (Gasperini, Mano & Reis, 2014). Essa propriedade tem impulsionado a aplicação de hidrogéis como materiais precursores para impressão 3D, devido a sua capacidade para encapsular nutrientes, imitar o microambiente natural do tecido, alcançar elevado grau de biocompatibilidade e capacidade de serem moldados praticamente em qualquer tamanho, forma ou configuração desejada (Xie et al., 2023).

A impressão 3D é uma metodologia inovadora que tem revolucionado diversos setores, incluindo alimentício, biomédico, cosmético e farmacêutico (Mandal et al., 2023; Fernandes et al., 2023). A metodologia de extrusão é a mais empregada entre os métodos de impressão 3D, envolvendo a extrusão contínua de filamentos alinhados, conforme tamanho e forma desejados, mantendo também a estabilidade dimensional das estruturas (Kadival et al. 2023). Entretanto, existem desafios inerentes à impressão 3D empregando extrusão, que incluem parâmetros de

impressão, como diâmetro da agulha, velocidade e temperatura de impressão (Fernandes et al., 2023).

Para alcançar a printabilidade ideal na impressão 3D, os materiais precursores devem apresentar viscosidade suficiente para manter a integridade estrutural, a qual depende principalmente de sua composição, propriedades físico-químicas e reológicas (Outrequin et al., 2023). Estratégias destinadas a aprimorar a viscosidade incluem o aumento das concentrações de polímeros, combinação de materiais e impressão em temperaturas próximas à sua transição de solução para gel (Giliomee et al. 2022). Para isso, polímeros naturais como fucoidano, ágar (Reys et al., 2023) e alginato de sódio (Gasperini, Mano & Reis, 2014) podem ser aplicados para produção dessas matrizes.

O fucoidano é um heteropolissacarídeo sulfatado extraído de algas pardas composto por fucose, sulfato e outros monossacarídeos (Lim et al., 2016), reconhecido por suas atividades biológicas. No entanto, o fucoidano é um polissacarídeo não gelificante (Reys et al. 2023) e sua aplicação requer o uso combinado com outros polissacarídeos como o alginato de sódio encontrado na parede celular de algas pardas, e se destaca por sua capacidade de gelificação (Nezamdoost-Sani et al., 2023), tornando-o atraente para diversos setores industriais. Além disso, o alginato de sódio possui baixo custo, não tóxico, biodegradável e biocompatível (Wei et al., 2023; Gheorghita Puscaselu et al., 2020). Entretanto, o alginato de sódio apresenta algumas limitações com instabilidade térmica e mecânica (Gheorghita Puscaselu et al., 2020), requerendo o uso de agentes reticulantes como  $\text{CaCl}_2$  entre outros cátions divalentes para formação de uma matriz coesa (Angaria et al. 2024). Além dos polissacarídeos acima citados, tem-se o ágar, que é extraído de algas vermelhas, sendo composto por agarose (fração gelificante) e agarpectina (fração não gelificante). A adição de ágar em uma matriz polissacarídica contribui para o aumento da viscosidade e da formação de gel, sendo este efeito devido às suas propriedades termo responsivas e gelificante valiosas para impressão 3D (Mostafavi & Zaeim, 2020).

Diversos estudos da literatura têm reportado a formação de hidrogéis a partir de ágar e alginato de sódio empregando agentes reticulantes para formação do gel (Falcone et al., (2022), Oyinloye & Yoon (2021); James & Moawad (2023). Em contrapartida, hidrogéis foram formulados com ágar (1,2-3,5%) e fucoidano (3-5%),

sem o emprego de agentes reticulantes (Reys et al., 2023). Outro estudo comprovou a interação entre os polissacarídeos alginato de sódio (0,25%) e fucoidano (0,25%) (Brovko et al., 2023). Esses resultados reforçam a possível interação entre os polímeros, tornando interessante o desenvolvimento de uma formulação de hidrogel contendo fucoidano, alginato e ágar com propriedades potencialmente adequadas para aplicação em tecnologia de impressão 3D.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver formulações de hidrogel contendo fucoidano, extraído de *Sargassum cymosum* C. Agardh, alginato de sódio e ágar, ambos comerciais, através da gelificação térmica na elaboração das matrizes poliméricas, visando potencial aplicação na tecnologia de impressão 3D. As formulações foram caracterizadas através de análises físicas (reologia, potencial zeta, diâmetro da partícula, e índice de polidispersão), químicas e estruturais (MIR-ATR e microscopia eletrônica de varredura). Adicionalmente, parâmetros de impressão 3D, como diâmetro da agulha e velocidade de impressão foram avaliados por meio de precisão de deposição (DA) e taxa de espalhamento (SR) para seleção da formulação mais adequada para impressão de cubos (15x15x15 mm). As estruturas 3D foram submetidas aos testes de precisão de impressão, estabilidade da forma e análise de textura.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Material**

Algas pardas do gênero *Sargassum cymosum* C. Agardh, coletadas em Praia Grande, Ubatuba, São Paulo, Brasil (23°28'00"S - 45°03'36"W), foram higienizadas com água clorada (25 ppm), e secas em estufa (Modelo 420-1D, Ethik Technology, Vargem Grande Paulista, Brasil) a 45 °C por 12 h. O material foi moído em um moinho de facas e o pó armazenado em recipientes herméticos. AG e SA (baixa massa molecular) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

### **2.2. Extração do fucoidano**

Algas em pó (7 g) foram tratadas com etanol 99% (100 mL) durante 3 h, em agitador orbital (Modelo TE-141, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Esta etapa foi realizada duas vezes. A amostra foi filtrada a vácuo e seca em estufa (Modelo 420-1D, EthikTechnology) durante a noite a 40°C (Nogueira et al., 2022).

As algas pré-tratadas foram submetidas ao tratamento com água e ácido cítrico (20%) até atingir pH 1.5 com a proporção de 1g de biomassa para 27 mL de solvente, por 11 min e 240 W de potência ultrassônica. A suspensão foi filtrada à vácuo e cloreto de cálcio (3% m/v) foi adicionado ao sobrenadante (1:1 v/v) para precipitar o alginato de sódio durante a noite a 4°C, a suspensão foi centrifugada (4000 rpm e 30 min). O sobrenadante foi recuperado e etanol a 99% (1:2 v/v) foi adicionado para precipitar o fucoidano durante a noite a 4°C (Hifney, et al., 2016; Fawzy & Gomaa, 2021). A solução foi centrifugada (4000 rpm e 30 min), o fucoidano precipitado e seco em estufa a 60°C (Fawzy & Gomaa, 2021) e armazenado em dessecador.

### **2.3. Formulação dos hidrogéis**

As formulações dos hidrogéis foram preparadas por gelificação térmica após testes prévios e com base nos estudos de Wang et al. (2021) e Reys et al. (2023). Nos testes preliminares foram testadas diferentes concentrações de fucoidano (0,25-1%) e ágar (1-4%). No entanto, o aumento da concentração de fucoidano não favorecia a formação do gel ou o gel formado era fraco, assim o alginato de sódio foi inserido na formulação para os testes preliminares também.

Após ensaios preliminares, e a fim de investigar a interação entre os polissacarídeos, foram propostas 3 formulações, variando a concentração de alginato e ágar (Tabela 1). A concentração final da matriz polissacarídica foi de 5%. Ágar e alginato de sódio foram hidratados em água destilada (20 mL) durante a noite. Subsequentemente, fucoidano em pó (1% m/v) foi introduzido aos polissacarídeos hidratados, homogeneizado em vortex durante 30 s e posteriormente aquecido em banho maria a 95 °C por 5 min. Após este processo, os hidrogéis formulados foram mantidos em estufa de circulação de ar a 45 °C até posterior utilização.

**Tabela 1.** Formulações dos hidrogéis com fucoidano, alginato de sódio e ágar

Formulação	Concentração final de polissacarídeo (%)		
	Fucoidano (FU)	Ágar (AG)	Alginato de sódio (SA)
1%FU 1%AG 3%SA	1	1	3
1%FU 2%AG 2%SA	1	2	2
1%FU 3%AG 1%SA	1	3	1

#### 2.4. Potencial zeta (ZP), diâmetro da partícula, índice de polidispersão (PDI) e pH

O potencial zeta (ZP), diâmetro das partículas ( $\mu\text{m}$ ) e índice de polidispersão (PDI) da solução de FU (1%) e das formulações (Tabela 1) foram determinados usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Litesizer 500, Anton Paar) a 25°C. A carga superficial foi expressa como potencial zeta (mV). A análise de pH foi realizada através de pHmetro de bancada (mPA 210, MS TECNOPON, Piracicaba/SP, Brasil). Todas as análises foram conduzidas em triplicatas.

#### 2.5. Análises reológicas

As propriedades reológicas das amostras, em cisalhamento estacionário e oscilatório, foram realizadas utilizando um reômetro rotacional (MCR 92, Anton Paar, Graz, Áustria). No cisalhamento estacionário, curvas de fluxo variando de 0,01 a 300  $\text{s}^{-1}$  (40 °C) foram determinadas usando geometria de cilindros concêntricos para as formulações (Tabela 1) e sistema de parede dupla para a solução de fucoidano (1%). A tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) foi registrada em função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ).

Os dados experimentais de medição foram avaliados e ajustados à Lei de Potência (Eq. 1) e à Lei de Newton (Eq. 2):

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

$$\tau = \mu_{\text{dyn}} * \dot{\gamma} \quad (2)$$

Onde  $\tau$  é a tensão de cisalhamento (Pa.s),  $\dot{\gamma}$  é a taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ ),  $k$  é o coeficiente de consistência ( $Pa.s^n$ ),  $\mu_{dyn}$  é a viscosidade dinâmica (Pa.s) e  $n$  é o índice de comportamento de fluxo (-).

Nos ensaios oscilatórios foram efetuados testes de rampas de temperatura, tixotropia, varredura de amplitude e frequência. Rampas de temperatura foram feitas usando geometria de cilindros concêntricos, registradas de 65 a 25 °C com taxa de cisalhamento fixa (1%) e frequência ( $62,83 s^{-1}$  ou 10 Hz) para seleção da temperatura de impressão. A escolha da temperatura adequada para impressão 3D se baseia na temperatura de gelificação das matrizes poliméricas, visando melhorar a viscosidade das formulações durante a extrusão, garantindo a solidificação de maneira consistente e uniforme durante o processo de impressão (Wei et al. 2015). Esse controle de temperatura é crucial para evitar problemas de printabilidade, como precisão de deposição, e garantir a integridade da estrutura final.

A avaliação da tixotropia das formulações foi realizada através do teste de tixotropia de três intervalos (3ITT) usando a geometria placa-placa a 40 °C, para investigar o comportamento das formulações durante o processo de impressão. No primeiro, aplica-se uma taxa de cisalhamento de  $0,1 s^{-1}$  durante 60 s. O segundo intervalo simula a extrusão através da agulha, com o aumento da taxa de cisalhamento para  $100 s^{-1}$  por 10 s e, finalmente, redução para  $0,1 s^{-1}$  por 120 s, simulando as condições pós impressão.

As varreduras de amplitude e frequência foram realizadas usando geometria cone-placa (40 mm). A varredura de amplitude de deformação oscilatória (0,01 a 100%) foi conduzida a 10 Hz a fim determinar a faixa viscoelástica linear (LVE), o limite de linearidade e o ponto de fluxo. A varredura de frequência ( $0,1$  a  $100 rad s^{-1}$ ) foi conduzida com deformação fixada em 0.1%. O módulo de armazenamento ( $G'$ ) e o módulo de perda ( $G''$ ) foram registrados a 25 °C para investigar a resistência da estrutura após a impressão. O fator de perda ( $\tan \delta = G''/ G'$ ) foi mensurado na varredura de frequência.

## **2.6. Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR)**

As interações moleculares dos polissacarídeos utilizados foram avaliadas por Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR) usando um PerkinElmer

Spectrum One foi utilizado para registrar o espectro na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , adquirindo 32 varreduras com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  a 25°C.

### **2.7. Microscopia ele eletrônica de varredura (MEV)**

A estrutura morfológica das três formulações foi analisada usando um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, modelo EVO MA 15). As amostras liofilizadas foram revestidas com ouro. As amostras foram analisadas com uma energia de 20 kV e ampliações de 100x, 500x e 1Kx.

### **2.8. Aparência visual e estabilidade das formulações**

As matrizes poliméricas foram colocadas em tubos falcon (50 mL) foram acondicionadas em dessecador por 24 h à temperatura ambiente. Após este período, os tubos foram agitados suavemente, e a aparência e estabilidade dos hidrogéis foram avaliadas (Fernandes et al. 2023).

### **2.9. Processo de impressão e printabilidade**

Uma bioimpressora 3D Modelo Educacional “Starter” (3DBS, Campinas, SP, Brasil). TinkerCad (<https://www.tinkercad.com>) foi utilizado para desenhar as estruturas. Um software gerador de código G (Slicer) foi usado para gerar o arquivo compatível com 3DBS, incluindo coordenadas e parâmetros para imprimir os modelos. O ImageJ (National Institute of Health, Gaithersburg, MD, EUA) foi utilizado para medir o tamanho e o diâmetro dos filamentos e da estrutura 3D.

#### **2.9.1. Precisão de deposição (DA) e taxa de espalhamento (SR)**

As formulações foram carregadas em seringas de 10 mL e, em seguida, três filamentos (6 cm de comprimento e 0,3 cm de largura), em triplicata, foram impressos em diferentes velocidades de impressão (2, 10 e 20 mm/s) e diâmetros de agulha (0.8 e 1.2 mm). As dimensões comprimento e diâmetro dos filamentos extrusados foram comparados com o projetado pelo TinkerCad. A precisão de deposição (DA) e a taxa de espalhamento (SR) foram avaliadas utilizando as equações 3 e 4. Valores de DA e SR próximos de 1, indicam maior precisão do processo de impressão (Munoz-Perez, et al. 2023). A formulação com os melhores valores de DA e SR foi utilizada para impressão das estruturas 3D (cubos).

$$\text{Precisão de deposição} = \frac{\text{Filamento impresso}}{\text{Filamento desenhado}} \quad (3)$$

$$SR = \frac{\text{Diâmetro impressa}}{\text{Diâmetro desenhada}} \quad (4)$$

### 2.9.2. Impressão 3D

Cubos foram impressos (15 x 15 x 15 mm) com os parâmetros encontrados nos testes de DA e SR. A capacidade de impressão de estruturas 3D, pelas diferentes formulações, foi avaliada quanto à precisão de impressão, estabilidade da estrutura e textura. A precisão e estabilidade da impressão de estruturas 3D foram avaliadas pelas medidas da altura e largura dos cubos utilizando o software ImageJ. As equações 5 e 6 foram utilizadas para os cálculos (Pan et al. 2022).

$$\text{Precisão de impressão} = \left(1 - \frac{Ac - Aa}{Ac}\right) \times 100\% \quad (5)$$

Onde Ac é o valor da altura e largura do cubo projetada no TinkerCad e Aa é o valor medido no ImageJ

$$\text{Estabilidade de impressão} = \left(1 - \frac{Ab - Aa}{Ab}\right) \times 100\% \quad (6)$$

Onde Aa é o valor da altura e largura do cubo projetada no TinkerCad após impressão e Ab é o valor da altura e largura do cubo após uma 1h de impressão.

### 2.9.3. Análise do perfil de textura (TPA)

Os cubos foram submetidos à avaliação do perfil de textura (TPA) usando um analisador de textura (TA.XTplusC - Extralab). A medição foi realizada com dois testes sequenciais de compressão com uma sonda de placa cilíndrica (diâmetro de 20 mm). As amostras foram comprimidas a uma taxa de compressão de 1 mm/s. As configurações do teste foram: velocidade pré-teste de 1 mm/s, velocidade do teste de 1 mm/s e velocidade pós-teste de 1 mm/s (Kuo et al., 2021). Toda análise foi realizada em triplicata. Os parâmetros de textura avaliados foram: dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, gomosidade, mastigabilidade.

## **2.10. Análises estatísticas**

As análises foram conduzidas em triplicata e os resultados das análises físicas e estruturais foram apresentados com a média  $\pm$  desvio padrão. Os ajustes de modelo da Lei da Potência e Newtoniano e análises estatísticas foram realizados utilizando Origin® 8.5 (Microcal, Northampton, MA, EUA). A ANOVA foi empregada para identificar diferenças significativas, seguida e teste de Tukey como pós-teste. O valor  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **3. Resultados e discussão**

### **3.1. Potencial zeta (ZP), diâmetro de partícula, PDI e pH**

O potencial zeta (ZP), diâmetro da partícula, índice de polidispersão e pH da solução de fucoidano (1%) e das formulações estão mostrados na Tabela 2. A combinação dos polissacarídeos acarretou na mudança do pH, devido às concentrações e interações que ocorreram durante o processo de formação das matrizes.

O aumento da concentração do alginato de sódio nas formulações resultou na diminuição do potencial zeta devido ao aumento de cargas negativas dos grupos carboxílicos presentes na solução, juntamente com as cargas negativas do sulfato contido no fucoidano, causando estabilidade das matrizes poliméricas por meio de repulsão (Kavoosi et al. 2018; Xi et al. 2023). No entanto, a matriz com maior concentração de ágar alcançou valores de PZ próximos de zero. Isso pode ser consequência da protonação dos grupos carboxílicos e sulfatos do alginato e fucoidano, diminuindo os efeitos repulsivos entre as partículas devido a forças atrativas de Van der Waals entre os polímeros e ligações de hidrogênio (Song et al. 2022 e Wang et al., 2021).

O índice de polidispersão (PDI) indica a distribuição de tamanho de partículas em uma solução, isto é, a homogeneidade do sistema coloidal. Este valor varia de 0 a 1 e quanto mais próximo de zero, mais monodispersa é a amostra e, portanto, menor probabilidade de agregação. Por outro lado, valores próximos de 1, indicam maior probabilidade de precipitação devido a agregação causada pela ampla variação de tamanho de partículas (Wang et al., 2021). Valores de PDI inferiores a 0,5

juntamente com um potencial zeta  $\pm 30$  mV indicam boa dispersão e estabilidade coloidal (Wang et al., 2021).

A solução de fucoidano (1%) exibiu valor de PDI próximo de zero, porém com potencial zeta fora da faixa de estabilidade coloidal ( $\pm 30$  mV), indicando tendência à agregação e precipitação. Em contraste, as mesmas concentrações de alginato de sódio e ágar (2%), exibiram o menor valor de PDI ( $< 0,5$ ) e bom potencial zeta (-25.5 mV), valores próximos ao considerado satisfatórios, exibindo uma estabilidade coloidal que é desejada para matrizes poliméricas. Apesar da formulação com maior concentração de alginato de sódio exibir potencial zeta maior que -30 mV, seu valor de PDI foi maior que 0,5, sugerindo que há uma ampla variação no tamanho das partículas e que tem tendência a agregação e precipitação do material. Por fim, a formulação com maior concentração de ágar exibiu os piores resultados de potencial zeta e PDI, demonstrando baixa estabilidade coloidal.

Com relação ao diâmetro das partículas, um alto diâmetro de partícula (4.897  $\mu\text{m}$ ) foi encontrado na solução de fucoidano (1%), consequência da conformação de esfera adotada de sua estrutura em água, e também dos grupos sulfatos, presentes na cadeia polimérica, que aumentam o do diâmetro da partícula (Brovko et al. 2023). Por outro lado, as matrizes poliméricas exibiram diminuição no diâmetro das partículas em comparação com a solução de fucoidano, sugerindo interação e solubilidade dos polissacarídeos na solução, comportamento também verificado por Brovko et al. (2023). No entanto, a formulação composta por maior concentração de ágar (3%) apresentou tamanho de partícula próximo a solução de fucoidano, indicando baixa interação entre os polissacarídeos e baixa estabilidade coloidal, confirmados pelo potencial zeta e valor de PDI. Portanto, concentrações iguais de alginato de sódio e ágar (2%) apresentaram as melhores características de hidrogel para posterior impressão 3D.

**Tabela 2.** Características do fucoidano (1%) e formulações de hidrogéis, incluindo tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e pH

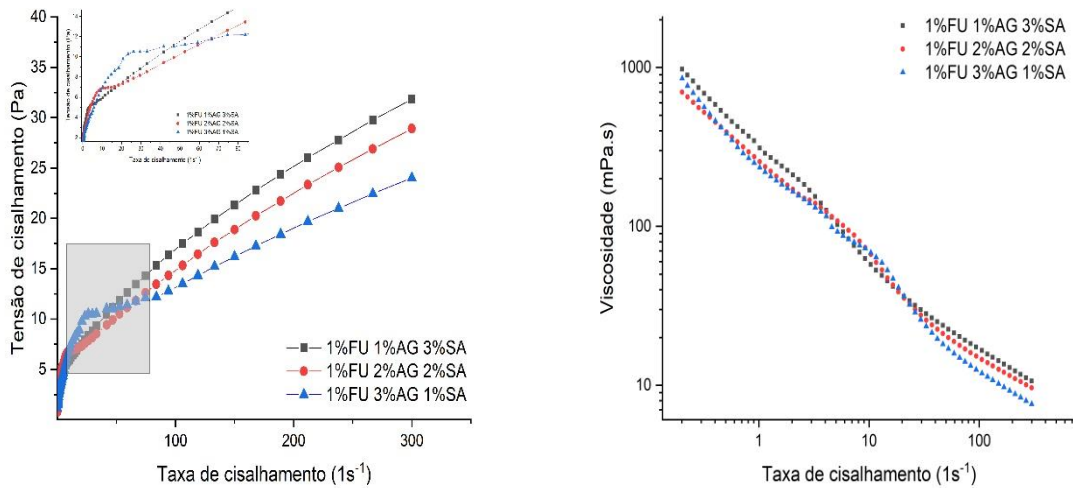
	<b>Diâmetro da partícula (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>	<b>Valor de PDI</b>	<b>pH</b>
Fucoidano (1%)	4,879 $\pm$ 20.5	-8.40 $\pm$ 0.78	0.256 $\pm$ 0.02	2.20
1%FU 1%AG 3%SA	3,275 $\pm$ 79.9	-35.26 $\pm$ 4.74	0.680 $\pm$ 0.00	3.45
1%FU 2%AG 2%SA	3,703 $\pm$ 22.62	-25.5 $\pm$ 2.47	0.483 $\pm$ 0.11	3.20
1%FU 3%AG 1%SA	4,373.5 $\pm$ 79.0	-2.06 $\pm$ 1.04	0.731 $\pm$ 0.05	3.00

### 3.2. Propriedades reológicas do fucoidano e das matrizes poliméricas

As propriedades reológicas dos polissacarídeos desempenham um papel crucial na qualidade da impressão 3D, sendo influenciadas pela concentração, temperatura, massa molecular, estrutura do polissacarídeo e combinação com outros polímeros (Giliomee et al. 2022). A solução 1% de fucoidano exibiu comportamento newtoniano (tabela 3), como também verificado por Reys et al. (2023) em concentrações do polissacarídeo variando entre 1-5%. O alginato de sódio (1-3%) também exibiu comportamento newtoniano relacionado à sua massa molecular (Jiao et al. 2019). Por outro lado, o ágar exibiu comportamento pseudoplástico, característico deste polissacarídeo, tornando-o atraente para formulação da matriz polimérica (Karatas, 2023).

Com base nestas informações, as matrizes poliméricas foram avaliadas por meio de curvas de fluxo (Figura 1). Os dados experimentais de tensão e taxa de cisalhamento se ajustaram satisfatoriamente ao modelo da Lei da potência ( $R^2 > 0,97$ ), exibindo comportamento pseudoplástico, evidenciado pelos valores de índice de comportamento do fluido ( $n < 1$ ) (Tabela 3). A viscosidade aparente das formulações decresceu com o aumento da taxa de cisalhamento. No entanto, a curva da matriz polimérica com 3% de ágar apresentou maior redução da viscosidade em comparação

às outras duas formulações. Essa diminuição pode ser atribuída ao baixo pH (3,00) desta matriz, o qual possivelmente desencadeou a hidrólise da estrutura, resultando na diminuição do poder gelificante do ágar (Mao et al. 2017).

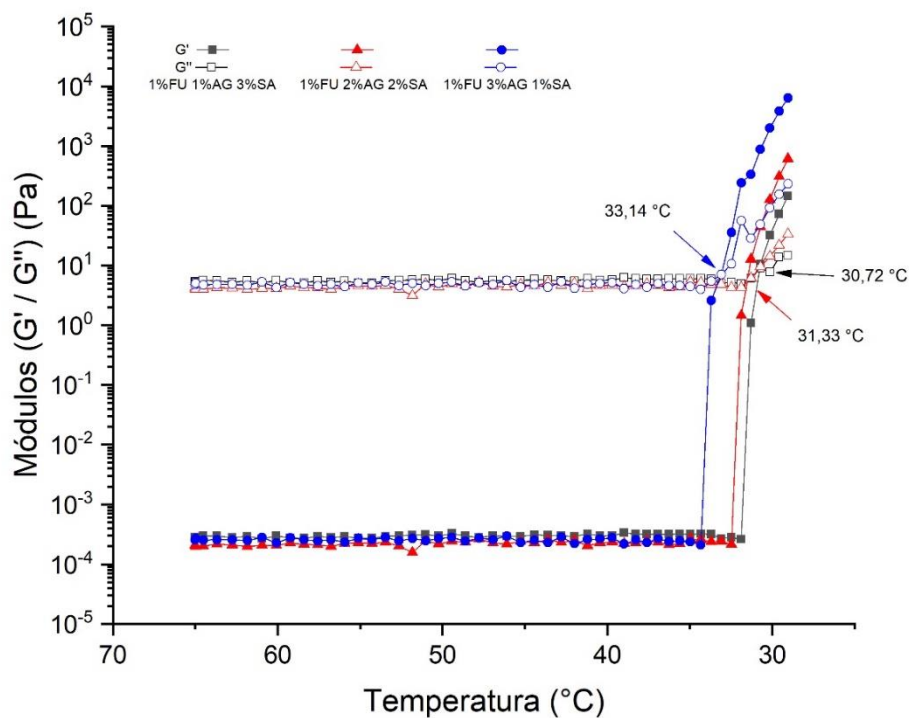


**Figura 1.** (A) Curvas de fluxo das matrizes poliméricas ajustadas ao modelo da Lei da Potência; (B) Viscosidade em função da taxa de cisalhamento. FU: fucoidano; SA: alginato de sódio; e AG: ágar

**Tabela 3.** Propriedades de escoamento das formulações (Índice de comportamento do fluido ( $n$ ), Índice de consistência ( $k$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ))

Formulação	$n$	$k$ (Pa.s <sup><math>n</math></sup> )	$R^2$
<b>Solução de fucoidano (1%)</b>	$1.0019 \pm 9.97 \cdot 10^{-4}$	$0.0007 \pm 3.67 \cdot 10^{-6}$	0.99
<b>1%FU 1%AG 3%SA</b>	$0.465 \pm 0.010$	$2.086 \pm 0.001$	0.98
<b>1%FU 2%AG 2%SA</b>	$0.444 \pm 0.010$	$2.078 \pm 0.107$	0.97
<b>1%FU 3%AG 1%SA</b>	$0.369 \pm 0.008$	$2.693 \pm 0.103$	0.98

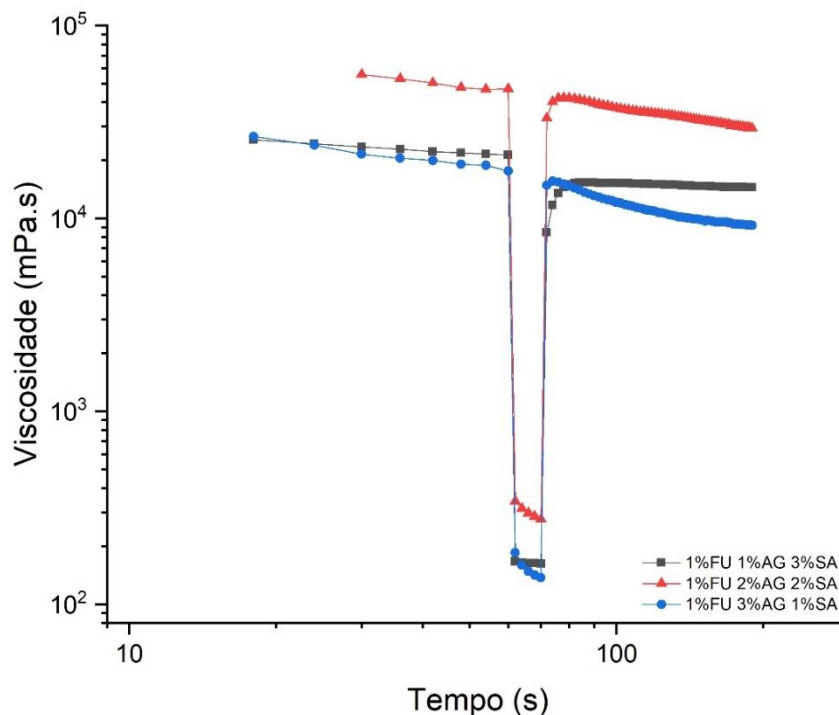
As matrizes poliméricas formuladas são materiais viscoelásticos que exibem características sólidas e líquidas, sendo influenciadas pela temperatura. Na impressão 3D, a temperatura é um parâmetro importante uma vez que influencia o comportamento reológico da formulação na saída da agulha da impressora (Giliomee et al. 2022). As rampas de temperatura revelaram diferença não significativa na temperatura de gelificação das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA (30,72 °C), 1%FU 2%AG 2%SA (31,33 °C) e 1%FU 3%AG 1%SA (33,14 °C) (Figura 2). Devido a essas pequenas variações, a temperatura de impressão foi ajustada para 40°C, temperatura do início da transição entre solução e gel, o que facilita a impressão das estruturas.



**Figura 2.** Rampas de temperatura (65-25°C) das formulações com módulo de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de perda ( $G''$ ) das formulações com 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA a uma taxa de resfriamento de 1 °C min<sup>-1</sup>

A taxa de recuperação é outro parâmetro crucial após a impressão pois está relacionado a printabilidade e qualidade das estruturas 3D (Demircan et al. 2023). Essa avaliação foi realizada por meio do teste tixotrópico de três intervalos, o qual fornece informações sobre o comportamento da formulação em baixas, altas e,

novamente, baixas taxas de cisalhamento, simulando o processo de impressão (Demircan et al. 2023). Formulações com comportamento tixotrópico são essenciais no processo de impressão por extrusão (Cui et al. 2024), pois está diretamente vinculado à printabilidade das estruturas, fator importante para qualidade da impressão final. Neste estudo, todas as formulações exibiram boa taxa de recuperação e reorganização da estrutura polimérica (Figura 3). Concentrações iguais de alginato de sódio e ágar exibiram a maior taxa de recuperação (79.6%), seguida pela formulação com maior concentração de alginato de sódio (71.5%) e, por fim, a que apresenta maior concentração de ágar (66.33%). Esta última formulação (3% de ágar) apresentou maior declínio na recuperação no terceiro intervalo, sugerindo que um rearranjo das moléculas. Os resultados obtidos mostraram boa recuperação tixotrópica uma vez que conseguiram recuperar pelo menos 70% de sua extensão (Cui et al., 2024).

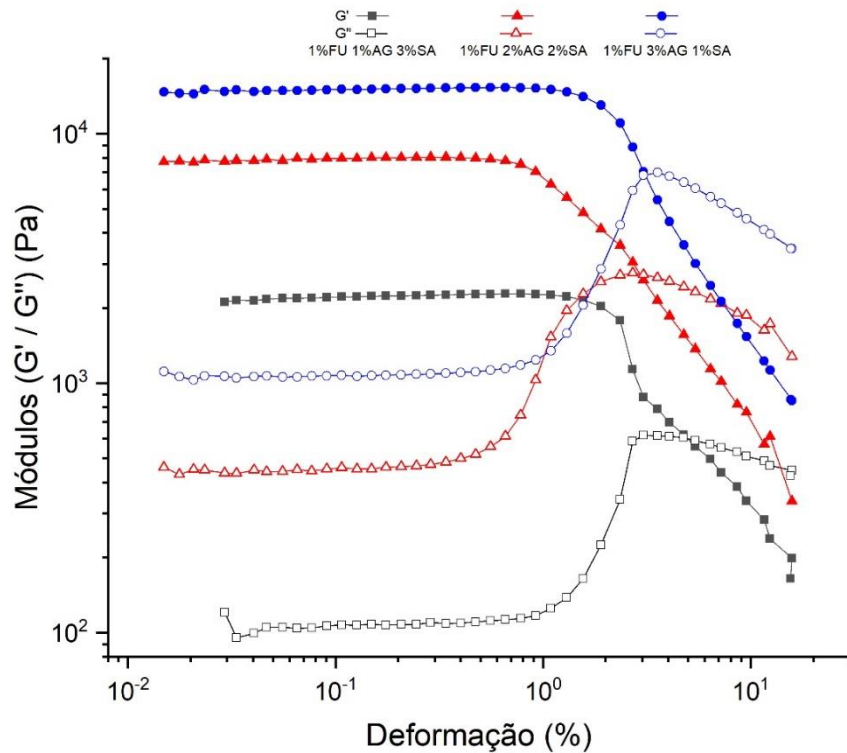


**Figura 3.** Tixotropia das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA

O comportamento viscoelástico das formulações estudadas, foram avaliados pela varredura de amplitude de deformação e varredura de frequência. A varredura

de amplitude de deformação avalia os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ) e descreve o comportamento de deformação das amostras na região viscoelástica linear (LVE), região onde a estrutura do hidrogel é preservada, assim como descreve o limite de linearidade, início da ruptura da estrutura (Jastram et al. 2021).

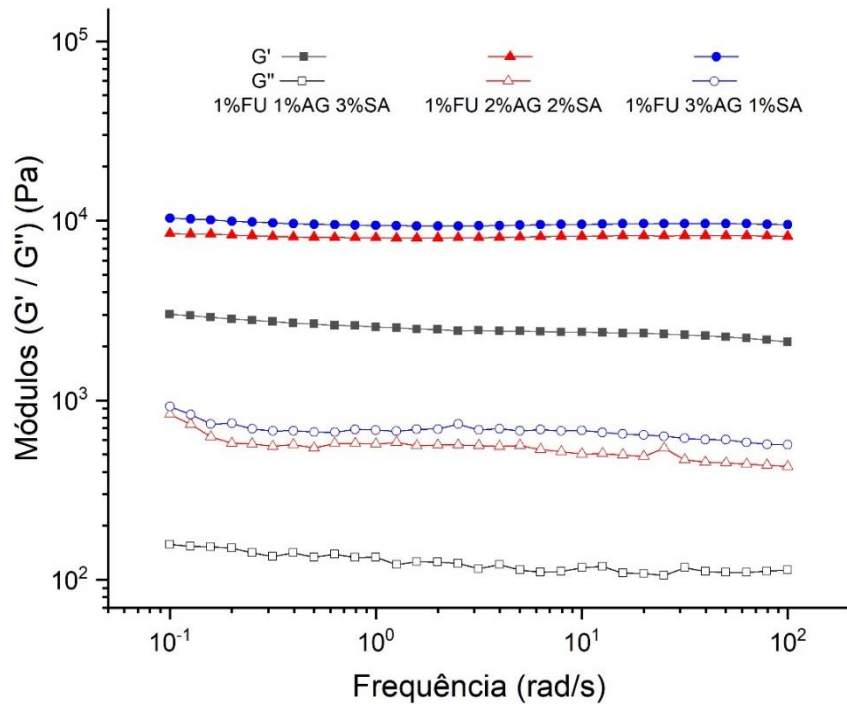
Todas as formulações estudadas apresentaram módulo elástico superior ao viscoso ( $G' > G''$ ) na região LVE (Figura 4), o que representa a força ou resistência do hidrogel. A maior concentração de ágar proporcionou aumento da força do gel. O limite de linearidade indica a fratura e a quebra da amostra (Jastram et al. 2021), obtido para cada formulação foi: 1%FU 1%AG 3%SA (0,778%), 1%FU 2%AG 2%SA (0,473%) e 1%FU 3%AG 1%SA (0,658%). Já o ponto de fluxo, a interseção entre  $G'$  e  $G''$  (Figura 4) apresenta a deformação na qual a amostra começa a fluir (Amorim et al., 2021). As matrizes poliméricas exibiam comportamentos bastante distintos com relação ao ponto de fluxo. A concentração de 3% de alginato de sódio exibiu ponto de fluxo baixo (588,7 Pa e 4,76%), seguida da formulação com concentrações iguais de alginato de sódio e ágar (2723,9 Pa e 2,7%), e, por fim, a com maior concentração de ágar (6816,9 Pa e 3,7%). Os resultados obtidos indicam que o menor ponto de fluxo pode estar relacionado a baixa resistência mecânica, comportamento este reportado por Kuo et al. (2021) com o aumento da concentração de alginato nas composições de suas matrizes.



**Figura 4.** Varredura de amplitude das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA

A varredura de frequência, conduzida utilizando a deformação (0,1%) encontrada na LVE (Figura 5), demonstrou que as matrizes poliméricas apresentaram comportamento elástico ( $G' > G''$ ), sendo ambos os módulos independentes ao longo da frequência, indicando estrutura sólida do tipo gel dominada por comportamento elástico (Saffold & Acevedo, 2022).

Através dos dados obtidos de  $G'$  e  $G''$  foi calculada a tangente de perda ( $\tan \delta = G'' / G'$ ). Valores de  $\tan \delta < 0.1$ , a estrutura da formulação é elástica, entre  $1 > \tan \delta > 0.1$  revela formulações pastosas enquanto para  $\tan \delta > 1$ , predomínio do comportamento de líquido (Rysenaer et al. 2023). As formulações exibiram valores de  $\tan \delta < 0.1$ , indicando estrutura elástica. Essa predominância do comportamento elástico é importante para manter a estrutura e estabilidade de um objeto impresso (Liu, Zhang & Bhandari, 2018). Os resultados dos testes reológicos revelaram que todas as formulações poderiam ser impressas. Entretanto, para melhor compreensão destas diferenças, as formulações foram submetidas ao teste de printabilidade encontrado na seção 3.6 deste trabalho.

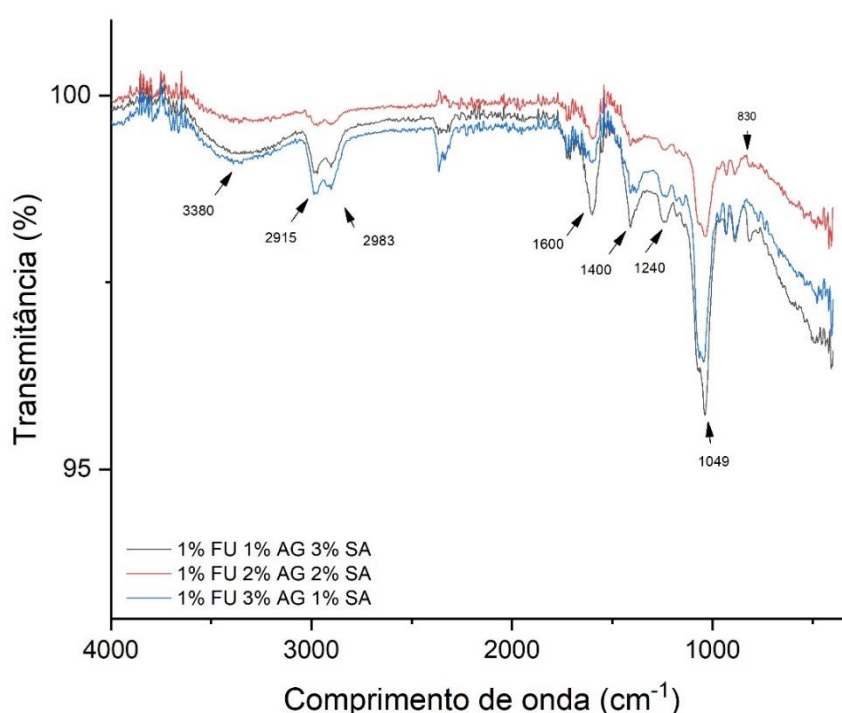


**Figura 5.** Varredura de frequência das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA

### 3.3. Espectroscopia no Infravermelho na região média (MIR-ATR)

A espectroscopia no infravermelho na região média é uma técnica utilizada para identificação de componentes químicos presentes em materiais poliméricos. A Figura 6 ilustra os espectros da análise por MIR-ATR das formulações e a intensidade da interação molecular entre fucoidano, ágar e alginato de sódio. Todas as formulações mostraram bandas de absorção em  $3380 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações de estiramento dos grupos O-H (Fernandes et al., 2023). A baixa intensidade desse pico pode indicar formação de ligações de hidrogênio entre os polímeros (Wang et al. 2021). As bandas de vibração de estiramento simétrico e assimétrico do grupo  $\text{CH}_2$  foram observadas a  $2983$  e  $2915 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. As bandas fracas verificadas em  $1400 \text{ cm}^{-1}$  e  $1600 \text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico dos grupos  $\text{COO}^-$  do alginato de sódio, respectivamente. O pico identificado em  $1049 \text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao estiramento C-O-C de ligações

glicosídicas do ágar e alginato de sódio (Jayashankar et al. 2021). A menor intensidade deste pico foi verificada na formulação 1%FU 2%AG 2%SA, sugerindo boa interação entre os polímeros, possivelmente acarretada pela formação de ligações de hidrogênio intermoleculares (Jayashankar et al. 2021). Os picos de absorbância em  $1240\text{ cm}^{-1}$  e  $840\text{-}820\text{ cm}^{-1}$ , correspondem à vibração de estiramento dos grupos sulfato ( $\text{S}=\text{O}$ ) (Reys et al. 2023). A formulação 1%FU 2%AG 2%SA apresentou menor intensidade nestes picos, sugerindo maior interação dos grupos sulfatos e o radical hidroxila.



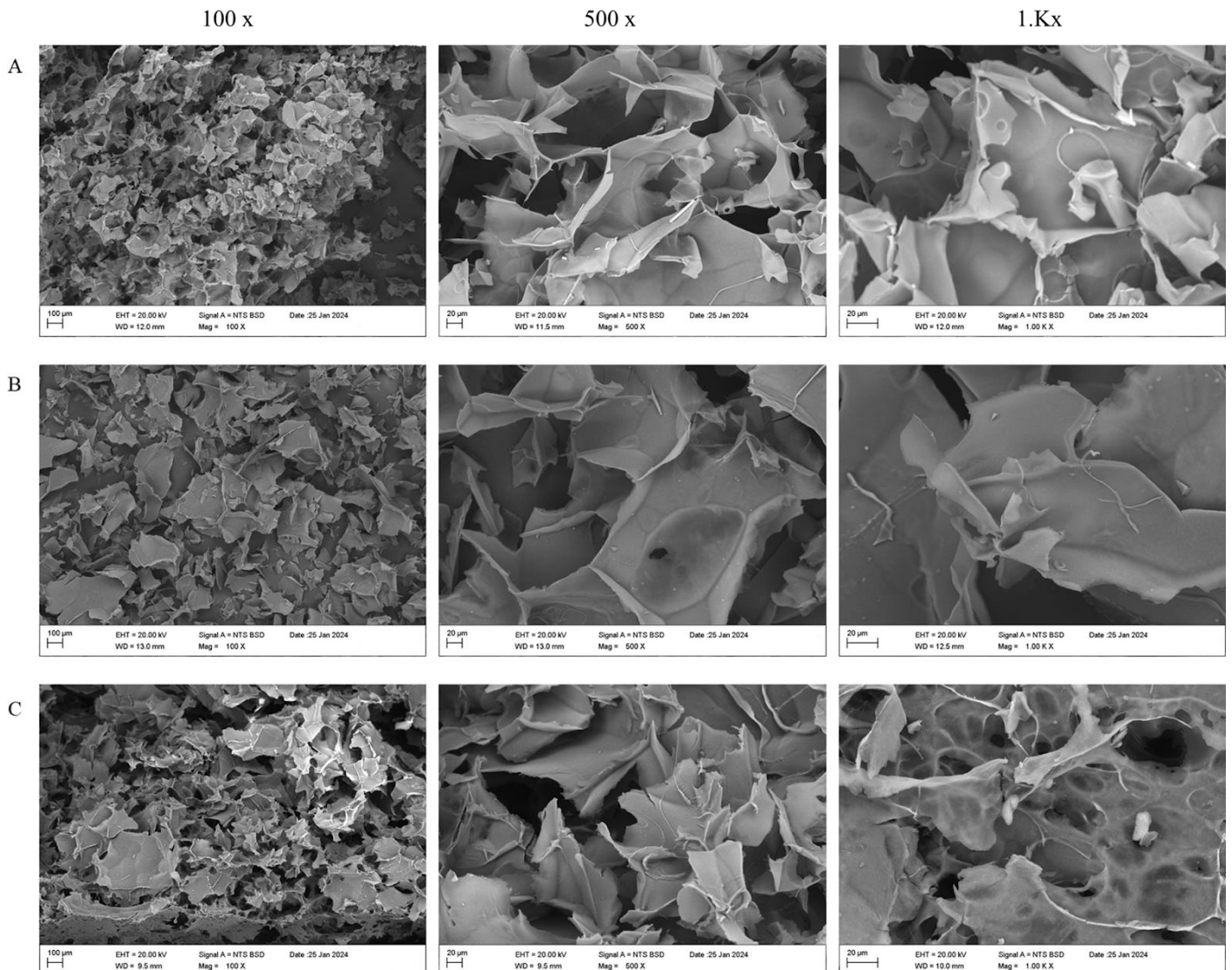
**Figura 6.** Espectro MIR-ATR das formulações: 1%FU 1%AG 3%SA, 1%FU 2%AG 2%SA e 1%FU 3%AG 1%SA

### 3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As formulações foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para obtenção de imagens de alta resolução das superfícies das amostras (Figura 7). Todas as formulações revelaram uma morfologia com aspecto de lâminas e macroporos irregulares, interligados devido a gelificação. Essas estruturas são atribuídas a interação entre os três polissacarídeos ou ao processo de congelamento

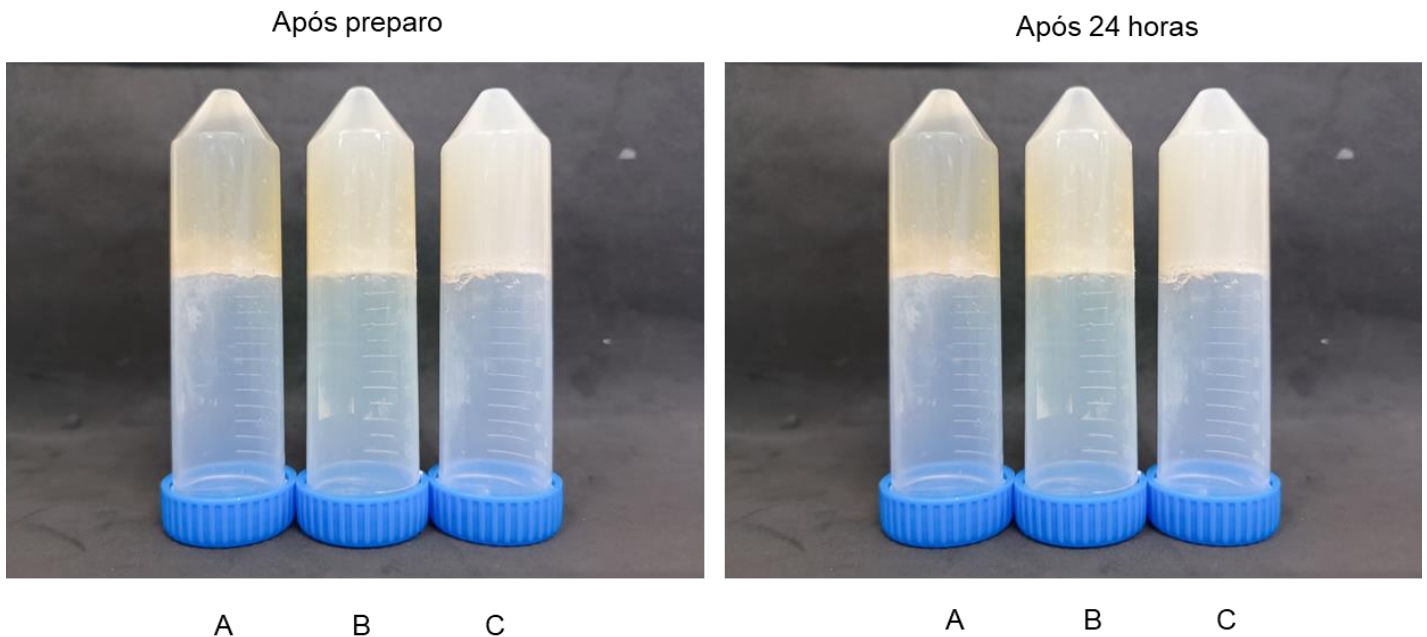
e liofilização empregado (Rysenaer et al. em 2023). A composição das formulações modificou a morfologia. Uma maior concentração de ágar (3%) proporcionou a formação de poros maiores (Figura 7C), como também verificado por Tripathi & Kumar (2011). Por outro lado, uma alta concentração de alginato de sódio (7A) proporcionou poros menores na estrutura (Gong, Kong & Wang, 2021). As concentrações iguais de alginato de sódio e ágar (2%), proporcionaram uma morfologia mais homogênea de lâminas, sem a formação de poros, sugerindo uma associação mais eficiente dos polissacarídeos.

**Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura das formulações: (A) 1%FU 1%AG 3%SA; (B) 1%FU 2%AG 2%SA and (C) 1%FU 3%AG 1%SA



### 3.5. Aparência visual e estabilidade das formulações

A aparência visual das matrizes poliméricas está apresentada na Figura 8. Notavelmente, a alta concentração de ágar resultou em uma coloração opaca. Por outro lado, uma alta concentração de alginato de sódio exibiu uma mudança para o marrom e um tom translúcido. O teste de inversão de tubo, realizado como parte da avaliação estrutural, indicou que todas as formulações foram capazes de formar estruturas estáveis logo após a preparação a temperatura ambiente, mantendo a estabilidade após 24 horas. Este aspecto é essencial para posterior impressão de estruturas 3D, uma vez que a capacidade de manter a forma ao longo do tempo é um dos requisitos para assegurar uma impressão bem sucedida, com excelente printabilidade e qualidade no constructo final.



**Figura 8.** Características visuais e confirmação da gelificação e estabilidade das formulações por meio do método do tubo invertido a temperatura ambiente após a preparação e depois de 24 horas. (A): 1% FU 1%AG 3%SA; (B) 1%FU 2%AG 2%SA e (C) 1%FU 3%AG 1%SA

### 3.6. Precisão de deposição (DA) e taxa de espalhamento (SR)

Filamentos das formulações foram impressos com diferentes diâmetros de agulha (1,2 e 0,8 mm) e velocidades de impressão (2, 10 e 20 mm/s). Nestas condições, todos os filamentos das formulações foram impressos, apesar de apresentarem diferente printabilidade. Todas as matrizes poliméricas apresentaram valores de precisão de deposição (DA) próximas de 1, indicando fidelidade ao comprimento projetado pelo software TinkerCad (Tabela 4). Entretanto, as formulações apresentaram ampla variação entre as taxas de espalhamento (SR), sendo os maiores valores de SR alcançados nas maiores concentrações de alginato de sódio ou ágar, independente dos diâmetros de agulha e da velocidade de impressão. As matrizes poliméricas sofreram resistência ao serem extrusadas pela agulha de 0,8 mm, ocorrendo, neste caso, entupimento da agulha ou deposição abrupta do material, principalmente para as formulações com maior concentração de 3% alginato de sódio. Alta concentração de ágar exibiu maior força de gel, confirmado no teste reológico de varredura de amplitude, no entanto, apresentou maior dificuldade de extrusão pela agulha, relacionada com a baixa estabilidade coloidal observada nos resultados de potencial zeta e PDI. O filamento dessa matriz em diferentes agulhas e velocidades de impressão apresentou a presença de grumos com alto valor de SR. Por outro lado, concentrações iguais de alginato de sódio e ágar apresentaram excelentes resultados de DA e SR com diâmetro de agulha de 1,2 mm e impressão em todas as velocidades. Embora não exista diferença significativa entre as três velocidades de impressão, optou-se por 10 mm/s para impressão de cubos, por apresentar o valor de SR mais próximo de 1 (Figura 9 e Tabela 4).



**Figura 9.** Teste de printabilidade. Filamentos produzidos com 1%FU 2%AG 2%SA com agulha de 1,2 mm e velocidade impressão 10 mm/s

**Tabela 4.** Precisão de deposição e taxa de espalhamento das formulações em diferentes diâmetros de agulha (0,8 mm and 1,2 mm) e velocidade de impressão (2, 10 and 20 mm/s) (continua)

Formulação	Diâmetro da agulha (mm)	Velocidade impressão (mm/s)	Comprimento do filamento (6 cm)	Largura do filamento (0.3 cm)	DA	SR
<b>1%FU 1%AG 3%SA</b>	1.2	2	6.13±0.06	0.52±0.01	1.02±0.06 <sup>bc</sup>	1.76±0.02 <sup>c</sup>
	1.2	10	6.12±0.01	0.63±0.01	1.02±0.01 <sup>bc</sup>	2.13±0.01 <sup>a</sup>
	1.2	20	6.13±0.03	0.54±0.01	1.02±0.01 <sup>bc</sup>	1.80±0.01 <sup>bc</sup>
	0.8	2	6.23±0.03	0.48±0.01	1.04±0.03 <sup>bc</sup>	1.62±0.01 <sup>cdef</sup>
	0.8	10	6.25±0.08	0.56±0.03	1.09±0.08 <sup>a</sup>	1.90±0.03 <sup>abc</sup>
	0.8	20	6.26±0.08	0.49±0.04	1.05±0.08 <sup>abc</sup>	1.63±0.05 <sup>cde</sup>
<b>1%FU 2%AG 2%SA</b>	1.2	2	6.08±0.02	0.33±0.02	1.01±0.02 <sup>bc</sup>	1.11±0.02 <sup>gh</sup>
	1.2	10	6.02±0.01	0.34±0.03	1.00±0.01 <sup>c</sup>	1.03±0.04 <sup>h</sup>
	1.2	20	6.03±0.01	0.36±0.03	1.02±0.01 <sup>bc</sup>	1.19±0.03 <sup>gh</sup>
	0.8	2	6.16±0.06	0.42±0.00	1.02±0.06 <sup>bc</sup>	1.41±0.00 <sup>defg</sup>
	0.8	10	6.17±0.01	0.39±0.03	1.04±0.02 <sup>abc</sup>	1.32±0.33 <sup>efg</sup>
	0.8	20	6.13±0.02	0.38±0.04	1.05±0.03 <sup>ab</sup>	1.29±0.05 <sup>fg</sup>

**Tabela 4.** Precisão de deposição e taxa de espalhamento das formulações em diferentes diâmetros de agulha (0.8 mm and 1.2 mm) e velocidade de impressão (2, 10 and 20 mm/s) (conclusão)

<b>1%FU 3%AG 1%SA</b>	1.2	2	6.20±0.00	0.50±0.01	1.03±0.00 <sup>bc</sup>	1.64±0.01 <sup>cde</sup>
	1.2	10	6.11±0.05	0.53±0.05	1.01±0.05 <sup>bc</sup>	1.78±0.05 <sup>bc</sup>
	1.2	20	6.12±0.06	0.47±0.04	1.03±0.06 <sup>bc</sup>	1.60±0.04 <sup>cdef</sup>
	0.8	2	6.28±0.02	0.63±0.03	1.04±0.02 <sup>abc</sup>	2.11±0.03 <sup>ab</sup>
	0.8	10	6.27±0.07	0.50±0.01	1.04±0.07 <sup>abc</sup>	1.67±0.01 <sup>cd</sup>
	0.8	20	6.25±0.03	0.50±0.04	1.06±0.03 <sup>ab</sup>	1.67±0.04 <sup>cd</sup>

\*Os resultados são reportados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

### 3.7. Impressão 3D e análise do perfil de textura (TPA)

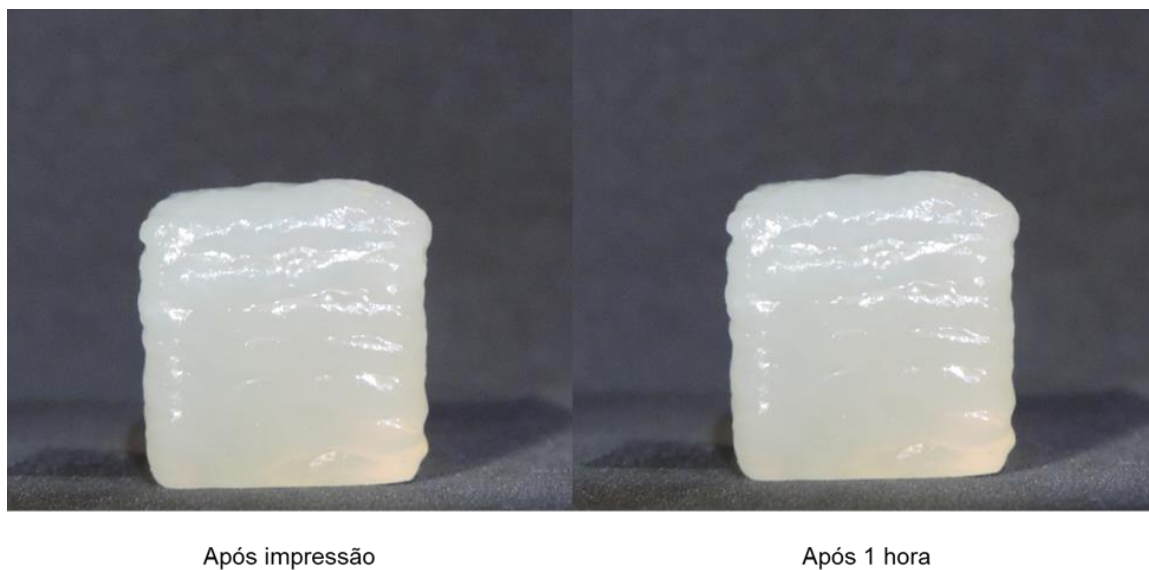
Os cubos impressos (15x15x15 mm) com concentrações iguais de alginato de sódio, agulha de 1,2 mm e velocidade de impressão de 10 mm/s, demonstraram ótimos resultados de precisão de impressão (99,66%±0,1) e estabilidade (99%±0,05), com baixa deformação e sem colapso da estrutura durante o período de 1 h (Figura 10).

Estes modelos 3D foram submetidos a análise do perfil de textura, fornecendo indicadores primários como dureza, adesividade, elasticidade e coesividade e indicadores secundários como mastigabilidade e gomosidade. Os resultados obtidos foram: dureza de 37g±0.06, adesividade de -5,63 g.s±1.79, elasticidade de 1.03 ± 0.00, coesividade de 1.04±0.14, gomosidade de 38.5 g±0.11, mastigabilidade de 40.0 g±0.11. Um alto valor de dureza indica uma textura firme do alimento (Mahat et al. 2020), o os cubos exibiram textura macia, devido ao baixo valor de dureza quando comparados ao estudo de Mahat et al. (2020), o qual avaliou diversas marcas de

gomas e obteve valores entre 12.532,3g a 586,4g. O valor de aderência revelou que o modelo 3D poderia ser facilmente deglutido devido ao valor menor que 0,5 (Riquelme et al. 2023), tornando seguro para consumo de uma ampla faixa etária.

A elasticidade representa o grau em que a amostra retorna a sua altura original após a compressão, cujos valores próximos de 1 indicam que houve deformação irreversível do material e o gel apresenta característica tanto viscosa quanto elástica (Zhan et al. 2024). Os valores baixos obtidos sugerem a quebra da estrutura em pedaços pequenos após a compressão, o que facilitaria a deglutição do material de acordo com Kuo et al. (2021) que encontrou uma elasticidade de  $0,92 \pm 0,06$  para goma comercial. A coesividade representa a desintegração do material em fragmentos durante o processo de mastigação (Li et al. 2020), ou seja, a sua capacidade em resistir a forças externas (Cebrián-Lloret et al. 2024). O resultado de coesividade indicou uma estrutura frágil e que pode ser facilmente quebrada durante a deglutição, exibindo um potencial para consumo.

A gomosidade é resultante do produto entre dureza e coesividade, portanto estão diretamente relacionados (Zhan et al. 2024). Esse parâmetro indica a força necessária para desintegrar uma amostra semi-sólida (Mostaghimi et al. 2023). O valor obtido indicou facilidade na desintegração dos cubos, devido seu ao baixo valor de dureza. Por fim, a mastigabilidade é calculada pelo produto da dureza, coesividade e elasticidade e representa a energia requerida durante o processo de mastigação antes de engolir (Mostaghimi et al. 2023). O resultado obtido revelou que os cubos podem ser triturados facilmente, devido ao seu baixo valor de dureza. Portanto, a impressão de modelos 3D foi possível através da mistura de polissacarídeos, demonstrando uma textura macia que possivelmente pode ser ingerida por uma ampla faixa etária e também utilizada como carreador para outros bioativos.



**Figura 10.** Cubo impresso (15x15x15 mm) com formulação a 1%FU 2%AG 2%SA, 1,2 mm de diâmetro da agulha e 10 mm/s após a impressão e 1 hora após

#### 4. Conclusão

Os polissacarídeos estudados (fucoidano, alginato de sódio e ágar) foram adequados para formação de hidrogéis híbridos por gelificação térmica e impressão 3D. Concentrações iguais de ágar e alginato apresentaram resultados satisfatórios para potencial zeta ( $-25,5 \pm 2,47$ ), diâmetro de partícula ( $3,703 \pm 22,62 \mu\text{m}$ ) e PDI ( $0,483 \pm 0,11$ ). Os testes reológicos demonstraram que todas as formulações apresentam comportamento pseudoplástico com temperatura de gelificação entre 30-35 °C. A melhor recuperação (79,6%) foi obtida com concentrações iguais de alginato de sódio e ágar. As formulações exibiram diferentes forças de gel.

A análise MIR-ATR confirmou a interação repulsiva entre os polissacarídeos através da observação dos picos característicos de cada polissacarídeo em todos os espectros e concentrações iguais de alginato de sódio e ágar apresentaram a maior interação entre os grupos carboxila, sulfato e hidroxila. As micrografias revelaram diferentes morfologias entre as matrizes poliméricas, iguais concentrações de alginato de sódio e ágar formaram uma matriz com formato de folhas e poucos poros. No entanto, o aumento do alginato de sódio ou ágar nas matrizes poliméricas levou a um aumento do número de poros e diferença nos tamanhos destes poros.

Concentrações iguais de alginato de sódio e ágar exibiram melhor printabilidade ( $DA=1,00 \pm 0,01$  e  $SR=1,03 \pm 0,04$ ) do que outras matrizes poliméricas. Os modelos 3D

apresentaram excelente precisão de impressão (99,66%±0,10) e preservaram sua integridade estrutural durante o teste de estabilidade (99%±0,05) por 1 hora. As estruturas impressas, avaliadas quanto à textura, destacaram-se pela maciez, tornando-as potencialmente adequadas para consumo por idosos e aplicação na indústria alimentícia e nutracêutica.

## 5. Referências

Amorim, P. A., d'Ávila, M. A., Anand, R., Moldenaers, P., Van Puyvelde, P., & Bloemen, V. (2021). Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting. *Bioprinting*, 22, Article e00129. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00129>

Angaria, N., Saini, S., Hussain, M. S., Sharma, S., Singh, G., Khurana, N., & Kumar, R. (2024). Natural polymer-based hydrogels: versatile biomaterials for biomedical applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-19. <https://doi.org/10.1080/00914037.2023.2301645>

Anisha, G. S., Padmakumari, S., Patel, A. K., Pandey, A., & Singhanía, R. R. (2022). Fucoidan from marine macroalgae: Biological actions and applications in regenerative medicine, drug delivery systems and food industry. *Bioengineering*, 9, 472.

Bahram, M.; Mohseni, N.; Moghtader, M. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. In *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*; Sutapa Biswas, M., Ed.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2016.)

Brovko, O., Palamarchuk, I., Gorshkova, N., & Bogolitsyn, K. (2023). Physicochemical properties and compatibility of sodium alginate and fucoidan solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, Article125309. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125309>

Cebrián-Lloret, V., Martínez-Abad, A., López-Rubio, A., & Martínez-Sanz, M. (2024). Exploring alternative red seaweed species for the production of agar-based hydrogels for food applications. *Food Hydrocolloids*, 146, 109177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109177>

Cui, Y., Yang, F., Wang, C. S., Blennow, A., Li, C., & Liu, X. (2024). 3D Printing windows and rheological properties for normal maize starch/sodium alginate composite gels. *Food Hydrocolloids*, 146, 109178. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109178>

Demircan, E., Aydar, E. F., Mertdinc, Z., Kasapoglu, K. N., & Ozcelik, B. (2023). 3D printable vegan plant-based meat analogue: Fortification with three different mushrooms, investigation of printability, and characterization. *Food Research International*, 173, 113259. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113259>

Falcone, G., Mazzei, P., Piccolo, A., Esposito, T., Mencherini, T., Aquino, R. P., ... & Russo, P. (2022). Advanced printable hydrogels from pre-crosslinked alginate as a

new tool in semi solid extrusion 3D printing process. *Carbohydrate Polymers*, 276, 118746. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118746>

Fawzy, M. A., & Gomaa, M. (2021). Optimization of citric acid treatment for the sequential extraction of fucoidan and alginate from *Sargassum latifolium* and their potential antioxidant and Fe (III) chelation properties. *Journal of Applied Phycology*, 33, 2523-2535. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02453-9>

Fernandes, A. S., Neves, B. V., Mazzo, T. M., Longo, E., Jacob-Lopez, E., Zepka, L. Q., & de Rosso, V. V. (2023). Bigels as potential inks for extrusion-based 3d food printing: Effect of oleogel fraction on physical characterization and printability. *Food Hydrocolloids*, 108986. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108986>

Gasperini, L., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2014). Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of the royal society Interface*, 11, Article 20140817. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0817>

Gheorghita Puscaselu, R., Lobiuc, A., Dimian, M., & Covasa, M. (2020). Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. *Polymers*, 12, 2417. <https://doi.org/10.3390/polym12102417>

Giliomee, J., du Toit, L. C., Klumperman, B., & Choonara, Y. E. (2022). Investigation of the 3D Printability of covalently cross-linked polypeptide-based hydrogels. *ACS omega*, 7(9), 7556-7571. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05873>

Gong, C., Kong, Z., & Wang, X. (2021). The effect of agarose on 3D bioprinting. *Polymers*, 13(22), 4028. <https://doi.org/10.3390/polym13224028>

Hifney, A. F., Fawzy, M. A., Abdel-Gawad, K. M., & Gomaa, M. (2016). Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum* sp. and its potential antioxidant and emulsifying activities. *Food Hydrocolloids*, 54, 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.022>

James, S., & Moawad, M. (2023). Study on composite hydrogel mixture of calcium alginate/gelatin/kappa carrageenan for 3D bioprinting. *Bioprinting*, 31, e00273. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00273>

Jastram, A., Claus, J., Janmey, P. A., & Kragl, U. (2021). Rheological properties of hydrogels based on ionic liquids. *Polymer Testing*, 93, 106943. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106943>

Jayashankar, T., Ping, M. K. X., Zhi, H. W., Yusop, N., & Ghazalli, N. F. (2021). Preparation and characterisations of alginate-agarose polymeric hydrogel for potential stem cell delivery. *Journal of Polymer Science and Technology*, 6(1), 11-22.

Jiao, W., Chen, W., Mei, Y., Yun, Y., Wang, B., Zhong, Q., ... & Chen, W. (2019). Effects of molecular weight and guluronic acid/mannuronic acid ratio on the rheological behavior and stabilizing property of sodium alginate. *Molecules*, 24(23), 4374. <https://doi.org/10.3390/molecules24234374>

- Kadival, A., Kour, M., Meena, D., & Mitra, J. (2023). Extrusion-based 3D food printing: printability assessment and improvement techniques. *Food and Bioprocess Technology*, 16(5), 987-1008. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02931-z>
- Karataş, M. (2023). Investigation on the Flow Behaviour of Agar Solution and Rheological Modelling. *Cumhuriyet Science Journal*, 44(2), 283-288. <https://doi.org/10.17776/csj.1068886>
- Kavoosi, G., Derakhshan, M., Salehi, M., & Rahmati, L. (2018). Microencapsulation of zataria essential oil in agar, alginate and carrageenan. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 418-425. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.010>
- Kuo, C. C., Qin, H., Cheng, Y., Jiang, X., & Shi, X. (2021). An integrated manufacturing strategy to fabricate delivery system using gelatin/alginate hybrid hydrogels: 3D printing and freeze-drying. *Food Hydrocolloids*, 111, 106262. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106262>
- Leyva-Jiménez, F. J., Oliver-Simancas, R., Castangia, I., Rodríguez-García, A. M., & Alañón, M. E. (2023). Comprehensive review of natural based hydrogels as an upcoming trend for food packing. *Food Hydrocolloids*, 135, 108124. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108124>
- Li, J., Xu, L., Su, Y., Chang, C., Yang, Y., & Gu, L. (2020). Flocculation behavior and gel properties of egg yolk/ $\kappa$ -carrageenan composite aqueous and emulsion systems: Effect of NaCl. *Food Research International*, 132, 108990. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108990>
- Lim, S. J., Aida, W. M. W., Maskat, M. Y., Latip, J., Badri, K. H., Hassan, O., & Yamin, B. M. (2016). Characterisation of fucoidan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *Food Chemistry*, 209, 267-273.
- Liu, Z., Zhang, M., & Bhandari, B. (2018). Effect of gums on the rheological, microstructural and extrusion printing characteristics of mashed potatoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 1179-1187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.048>
- Luo, B., Wang, Z., Chen, J., Chen, X., Li, J., Li, Y., ... & Zhong, S. (2023). Physicochemical Characterization and Antitumor Activity of Fucoidan and Its Degraded Products from *Sargassum hemiphyllum* (Turner) C. Agardh. *Molecules*, 28(6), 2610. <https://doi.org/10.3390/molecules28062610>
- Mahat, M. M., Sabere, A. S. M., Nawawi, M. A., Hamzah, H. H., Jamil, M. A. F. M., Roslan, N. C., ... & Safian, M. F. (2020). The sensory evaluation and mechanical properties of functional gummy in the Malaysian market. <https://doi.org/10.20944/preprints202010.0213.v1>
- Mandal, S., Nagi, G. K., Corcoran, A. A., Agrawal, R., Dubey, M., & Hunt, R. W. (2023). Algal polysaccharides for 3D printing: A review. *Carbohydrate Polymers*, 300, 120267. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120267>

Mao, B., Bentaleb, A., Louerat, F., Divoux, T., & Snabre, P. (2017). Heat-induced aging of agar solutions: Impact on the structural and mechanical properties of agar gels. *Food Hydrocolloids*, 64, 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.020>

Mostafavi, F. S., & Zaeim, D. (2020). Agar-based edible films for food packaging applications-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 1165-1176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.123>

Mostaghimi, M., Majdinasab, M., Golmakani, M. T., Hadian, M., & Hosseini, S. M. H. (2023). Development and characterization of antimicrobial alginate hydrogel beads filled with cinnamon essential oil nanoemulsion. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 34(15), 2144-2160. <https://doi.org/10.1080/09205063.2023.2230843>

Munoz-Perez, E., Perez-Valle, A., Igartua, M., Santos-Vizcaino, E., & Hernandez, R. M. (2023). High resolution and fidelity 3D printing of Laponite and alginate ink hydrogels for tunable biomedical applications. *Biomaterials Advances*, 149, Article 213414. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213414>

Nezamdoost-Sani, N., Khaledabad, M. A., Amiri, S., & Khaneghah, A. M. (2023). Alginate and derivatives hydrogels in encapsulation of probiotic bacteria: An updated review. *Food Bioscience*, Article 102433. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102433>

Niemczyk-Soczynska, B., Gradys, A., Kolbuk, D., Krzton-Maziopa, A., Rogujski, P., Stanaszek, L., ... & Sajkiewicz, P. (2022). A methylcellulose/agarose hydrogel as an innovative scaffold for tissue engineering. *RSC advances*, 12, 26882-26894. <https://doi.org/10.1039/D2RA04841H>

Nogueira, M. T., Chica, L. R., Yamashita, C., Nunes, N. S. S., Moraes, I. C. F., Branco, C. C. Z., & Branco, I. G. (2022). Optimal conditions for alkaline treatment of alginate extraction from the brown seaweed *Sargassum cymosum* C. Agardh by response surface methodology. *Applied Food Research*, 2, Article 100141. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100141>

Obluchinskaya, E. D., Pozharitskaya, O. N., & Shikov, A. N. (2022). In Vitro anti-inflammatory activities of fucoidans from five species of brown seaweeds. *Marine Drugs*, 20(10), 606. <https://doi.org/10.3390/md20100606>

Oliveira, C., Neves, N. M., Reis, R. L., Martins, A., & Silva, T. H. (2020). A review on fucoidan antitumor strategies: From a biological active agent to a structural component of fucoidan-based systems. *Carbohydrate Polymers*, 239, 116131. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116131>

Outrequin, T. C. R., Gamonpilas, C., Siriawatwechakul, W., & Sreearunothai, P. (2023). Extrusion-based 3D printing of food biopolymers: A highlight on the important rheological parameters to reach printability. *Journal of Food Engineering*, 342, 111371. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111371>

Oyinloye, T. M., & Yoon, W. B. (2021). Stability of 3D printing using a mixture of pea protein and alginate: Precision and application of additive layer manufacturing simulation approach for stress distribution. *Journal of Food Engineering*, 288, 110127. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110127>

Pan, H., Pei, F., Ma, G., Ma, N., Zhong, L., Zhao, L., & Hu, Q. (2022). 3D printing properties of *Flammulina velutipes* polysaccharide-soy protein complex hydrogels. *Journal of Food Engineering*, 334, 111170. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111170>

Reys, L. L., Silva, S. S., Soares da Costa, D., Rodrigues, L. C., Reis, R. L., & Silva, T. H. (2023). Building Fucoïdan/Agarose-Based Hydrogels as a Platform for the Development of Therapeutic Approaches against Diabetes. *Molecules*, 28, 4523. <https://doi.org/10.3390/molecules28114523>

Riquelme, N., Savignonés, C., López, A., Zúñiga, R. N., & Arancibia, C. (2023). Effect of Gelling Agent Type on the Physical Properties of Nanoemulsion-Based Gels. *Colloids and Interfaces*, 7(3), 49. <https://doi.org/10.3390/colloids7030049>

Rysenaer, V. B. J., Ahmadzadeh, S., Van Bockstaele, F., & Ubeyitogullari, A. (2023). An extrusion-based 3D food printing approach for generating alginate-pectin particles. *Current Research in Food Science*, 6, 100404. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.11.023>

Saffold, A. C., & Acevedo, N. C. (2022). The effect of mono-diglycerides on the mechanical properties, microstructure, and physical stability of an edible rice bran wax–gelatin biphasic gel system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 99(11), 1033-1043. <https://doi.org/10.1002/aocs.12640>

Song, X., Chiou, B. S., Xia, Y., Chen, M., Liu, F., & Zhong, F. (2022). The improvement of texture properties and storage stability for kappa carrageenan in developing vegan gummy candies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(9), 3693-3702. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11716>

Sudheer, S., Bandyopadhyay, S., & Bhat, R. (2023). Sustainable polysaccharide and protein hydrogel-based packaging materials for food products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125845. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125845>

Tripathi, A., & Kumar, A. (2011). Multi-featured macroporous agarose–alginate cryogel: Synthesis and characterization for bioengineering applications. *Macromolecular Bioscience*, 11(1), 22-35. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000286>

Wang, N., Tian, J., Wang, L., Song, S., Ai, C., Janaswamy, S., & Wen, C. (2021). Fucoïdan hydrogels induced by  $\kappa$ -carrageenan: Rheological, thermal and structural characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 514-520. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.111>

Wang, Y., Tan, C., Davachi, S. M., Li, P., Davidowsky, P., & Yan, B. (2021). Development of microcapsules using chitosan and alginate via W/O emulsion for the protection of hydrophilic compounds by comparing with hydrogel beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.089>

Wei, Q., Zhou, J., An, Y., Li, M., Zhang, J., & Yang, S. (2023). Modification, 3D printing process and application of sodium alginate-based hydrogels in soft tissue engineering:

A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, Article 123450. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123450>

Wei, X., Li, D., Jiang, W. et al. 3D Printable Graphene Composite. *Sci Rep* 5, 11181 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep11181>

Xi, X., Wei, Z., Xu, Y., & Xue, C. (2023). Clove Essential Oil Pickering Emulsions Stabilized with Lactoferrin/Fucoidan Complexes: Stability and Rheological Properties. *Polymers*, 15, 1820. <https://doi.org/10.3390/polym15081820>

Xie, X. T., & Cheong, K. L. (2022). Recent advances in marine algae oligosaccharides: Structure, analysis, and potential prebiotic activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(28), 7703-7717. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916736>

Zhan, L., Lan, G., Wang, Y., Xie, S., Cai, S., Liu, Q., ... & Xie, F. (2024). Mastering textural control in multi-polysaccharide gels: Effect of  $\kappa$ -carrageenan, konjac glucomannan, locust bean gum, low-acyl gellan gum, and sodium alginate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127885. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127885>

### 3. CONCLUSÃO GERAL

Este estudo avança significativamente na compreensão da estrutura e aplicação do fucoidano extraído da alga *Sargassum cymosum* C. Agardh. A otimização da extração, utilizando o delineamento experimental Box-Behnken se demonstrou eficaz para o aumento do rendimento do polissacarídeo. O material extraído exibiu estrutura complexa, composta principalmente por fucose, galactose, glicose e ácido glucurônico, além de apresentar pequenas porções de manose, arabinose, ramnose, xilose e ácido galacturônico. A presença da fucose e do sulfato foi confirmada por meio de MIR-ATR e <sup>1</sup>H NMR, que o caracterizam como fucoidano. O polissacarídeo exibiu atividade antioxidante apenas para ensaio ABTS.

Ao desenvolver matrizes poliméricas com o fucoidano extraído, alginato de sódio e ágar comerciais foram obtidos hidrogéis híbridos por gelificação térmica, possibilitando a impressão de estruturas. A matriz polimérica com concentrações iguais de alginato de sódio e ágar mostrou resultados satisfatórios de potencial zeta, diâmetro da partícula e PDI. A reologia revelou comportamento pseudoplástico das formulações com diferenças na temperatura de gelificação. Além disso, a formulação com concentrações iguais de alginato e ágar exibiu ótima taxa de recuperação. A matriz polimérica com maior concentração de ágar exibiu maior força de gel. Todas as formulações apresentaram estabilidade durante a varredura de frequência. Os espectros MIR-ATR e MEV indicaram a interação entre os grupos carboxílicos, sulfato e radical hidroxila dos polissacarídeos com maior interação na formulação com proporções iguais de alginato e ágar. Os hidrogéis com maiores concentrações de ágar se apresentaram opacos. Nos testes de printabilidade, as proporções iguais de alginato de sódio exibiram ótimos resultados para precisão de deposição e taxa de espalhamento. Os modelos 3D impressos resultaram em ótima precisão de impressão, estabilidade estrutural após 1 hora e textura macia devido aos baixos valores de dureza.

Em resumo, este estudo contribui não apenas para a compreensão aprofundada do fucoidano extraído da *Sargassum cymosum* C. Agardh, mas também destaca seu potencial na impressão 3D e emprego em diferentes nos setores como alimentício, nutricional, biomédico, farmacêutico e engenharia tecidual.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R. E., SU, P., PURI, M., RASTON, C. L., ZHANG, W. Optimization of biorefinery production of alginate, fucoidan and laminarin from brown seaweed *Durvillaea potatorum*. **Algal Research**, v. 38, p. 101389, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101389>
- ALBOOFETILEH, M., REZAEI, M., TABARSA, M., YOU, S. Ultrasound-assisted extraction of sulfated polysaccharide from *Nizamuddinia zanardinii*: Process optimization, structural characterization, and biological properties. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 2, p. e12979, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12979>
- BROVKO, O., PALAMARCHUK, I., GORSHKOVA, N., & BOGOLITSYN, K. Physicochemical properties and compatibility of sodium alginate and fucoidan solutions. **International Journal of Biological Macromolecules**, 125309, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125309>
- CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A. G., MEULLEMIESTRE, FABIANO-TIXIER, A. S., ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- CHEN, C. Y., WANG, S. H., HUANG, C. Y., DONG, C. D., HUANG, C. Y., CHANG, C. C., & CHANG, J. S. Effect of molecular mass and sulfate content of fucoidan from *Sargassum siliquosum* on antioxidant, anti-lipogenesis, and anti-inflammatory activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 132, n. 4, p. 359-364, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.06.005>
- FAWZY, M. A., & GOMAA, M. Optimization of citric acid treatment for the sequential extraction of fucoidan and alginate from *Sargassum latifolium* and their potential antioxidant and Fe (III) chelation properties. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, p. 2523-2535, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02453-9>
- FLÓREZ-FERNÁNDEZ, N., TORRES, M. D., GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J., & DOMÍNGUEZ, H. Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan. **Algal research**, v.30, p.128-148, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.002>
- FLÓREZ-FERNÁNDEZ, N., VAAMONDE-GARCÍA, C., TORRES, M. D., BUJÁN, M., MUÍÑOS, A., MUIÑOS, A., ... & DOMÍNGUEZ, H. Relevance of the extraction stage on the anti-inflammatory action of fucoidans. **Pharmaceutics**, v. 15, p. 808, 2023. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030808>
- GILIOME, J., DU TOIT, L. C., KLUMPERMAN, B., & CHOONARA, Y. E. Investigation of the 3D Printability of covalently cross-linked polypeptide-based hydrogels. **ACS omega**, v. 7, p. 7556-7571, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05873>

HE, X., & LU, Q. Design and fabrication strategies of cellulose nanocrystal-based hydrogel and its highlighted application using 3D printing: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 301, 120351, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120351>

LAELIOCATTLEYA, R. A., YUNIANITA, Y., RISJANI, Y., & WULAN, S. N. Characterization of 'novel fucoidan' extracted from brown seaweed (*Sargassum echinocarpum* J. Ag.) using Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) and its potential antioxidant activity. **Natural Product Research**, p. 1-13, 2023. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2282111>

LEYTON, A., PEZOA-CONTE, R., BARRIGA, A., BUSCHMANN, A. H., MÄKI-ARVELA, P., MIKKOLA, J. P., LIENQUEO, M. E. Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera* using an orthogonal experiment design. **Algal Research**, v. 16, p. 201-208, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.019>

LIM, S. J., AIDA, W. M. W., MASKAT, M. Y., MAMOT, S., ROPIEN, J., & MOHD, D. M. (2014). Isolation and antioxidant capacity of fucoidan from selected Malaysian seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.007>

LUO, B., WANG, Z., CHEN, J., CHEN X., LI, J., LI, Y., LI, R., LIU, X., SONG, B., CHEONG, K-L., ZHONG, S. Physicochemical characterization and antitumor activity of fucoidan and its degraded products from *Sargassum hemiphyllum* (Turner) C. Agardh. **Molecules**, v. 28, n.6, p. 2610, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28062610>

LORBEER, A. J., LAHNSTEIN, J., BULONE, V., NGUYEN, T., & ZHANG, W. (2015). Multiple-response optimization of the acidic treatment of the brown alga *Ecklonia radiata* for the sequential extraction of fucoidan and alginate. *Bioresource Technology*, v. 197, p. 302-309, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.103>

MABATE, B., DAUB, C. D. MALGAS, S., EDKINS, A. L., PLETSCHKE, B. I. Fucoidan structure and its impacts on glucose metabolism: implications for diabetes and cancer therapy. **Marine Drugs**, v. 19, n. 1, p. 30, 2021. <https://doi.org/10.3390/md19010030>

MANDAL, S., NAGI, G. K., CORCORAN, A. A., AGRAWAL, R., DUBEY, M., & HUNT, R. W. (2023). Algal polysaccharides for 3D printing: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 300, 120267, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120267>

KALIARAJ, G. S., SHANMUGAM, D. K., DASAN, A., & MOSAS, K. K. A. (2023). Hydrogels—A Promising Materials for 3D Printing Technology. **Gels**, v. 9, n. 3, p. 260. <https://doi.org/10.3390/gels9030260>

POVEDA-CASTILLO G. D. C., RODRIGO, D., MARTÍNEZ, A., PINA-PÉREZ, M. C. Bioactivity of Fucoïdan as an antimicrobial agent in a new functional beverage. **Beverages**, v. 4, n. 3, p. 64, 2018. <https://doi.org/10.3390/beverages4030064>

PRADHAN, B., NAYAK, R., PATRA, S., BHUYAN, P. P., BEHERA, P. K., MANDAL, A. K., BEHERA, C., KI J-S., ADHIKARY, S. P., MUBARAKALI D., JENA, M. A state-of-the-art review on fucoïdan as an antiviral agent to combat viral infections. **Carbohydrate Polymers**, v. 291, p. 119551, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119551>

WANG, J., ZHANG, Q., ZHANG, Z., SONG, H., LI, P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoïdan fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 6-12, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.10.015>

WANG, N., TIAN, J., WANG, L., SONG, S., AI, C., JANASWAMY, S., & WEN, C. Fucoïdan hydrogels induced by  $\kappa$ -carrageenan: Rheological, thermal and structural characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 514-520, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.111>

YU, J., LI, Q., WU, J., YANG, X., YANG, S., ZHU, W., ... & LU, J. Fucoïdan Extracted From Sporophyll of *Undaria pinnatifida* Grown in Weihai, China—Chemical Composition and Comparison of Antioxidant Activity of Different Molecular Weight Fractions. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 636930, 2021. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.636930>

ZHANG, R., YUEN, A. K. L., MAGNUSSON, M., WRIGHT, J. T., NYS, R. de, MASTERS, A. F., MASCHMEYER, T. A comparative assessment of the activity and structure of phlorotannins from brown seaweed *Carpophyllum flexuosum*. **Algal Research**, v. 29, p. 130-141, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.027>

ZAYED, A., CAO, H. T. T., TRANG, V. T. D., & ULBER, R. (2023). Structural tailoring of fucoïdan backbones for maximizing their benefits: Enzymatic, chemical, and physical strategies. **Journal of Applied Phycology**, v. 35 n.5, p. 2445-2462, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03036>