

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado somente a partir de 08/10/2025.

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.

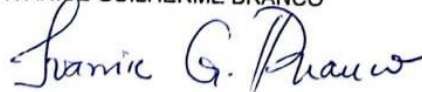
CDD 579.8



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 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**. 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 (^1H 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 ^1H 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 ± 2.47 mV), diâmetro da partícula ($3,703 \pm 22.62$ μm) e PDI (0.483 ± 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 (^1H 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 ^1H 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 ± 2.47 mV), particle diameter (3.703 ± 22.62 μm) and PDI (0.483 ± 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 ^1H NMR do fucoidano extraído de *Sargassum cymosum* C. Agardh na condição otimizada, em D_2O e 60°C44

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°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 fucoidano de algas pardas *Sargassum cymosum* C. Agardh por ultrassom: caracterização química e estrutural

Tabela 1. Delineamento experimental Box-Behnken com variáveis codificadas e reais (X₁: Razão Solvente/Biomassa; X₂: Tempo; X₃: Potência ultrassônica) e resposta (Rendimento de Fucoidano (%))33

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

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

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

Tabela 2. Características do fucoidano (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

^1H 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
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	Fucoidano
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
HCL	Ácido Clorídrico
HMWF	Fucoidano 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	Fucoidano de baixa massa molecular
LVE	Região linear viscoelástica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	minutos
MIR-ATR	Espectroscopia no Infravermelho na região média
MMWF	Fucoidano de média massa molecular
mPa.s	Milipascal por segundo

Mw	Massa molecular
<i>n</i>	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 δ = 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 (¹ 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 (¹ 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 (ζ), 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

4. Conclusão.....	80
5. Referências.....	81
3. CONCLUSÃO GERAL.....	87
4. REFERÊNCIAS.....	88

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 α -L-fucose sulfatada ligadas por ligações glicosídicas do tipo (1→3) ou constituída por ligações glicosídicas do tipo (1→3) alternadas com ligações do tipo (1→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 (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 mL g^{-1} a 40 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, ¹H 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.

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 ¹H 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., MUÍÑOS, 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 κ -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>