Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Vasco Filipe Ferreira Pontes

Estruturas fibrosas bioativas com base em fibras produzidas a partir de algas

novembro de 2023

Estruturas fibrosas bioativas com base em fibras produzidas a partir de algas

Vasco Pontes

UMinho | 2023

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Vasco Filipe Ferreira Pontes

Estruturas fibrosas bioativas com base em fibras produzidas a partir de algas

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Engenharia Têxtil
Área de Especialização em Materiais e Acabamentos Funcionais

Trabalho efetuado sob orientação de:
Doutora Diana Sara Pereira Ferreira
Professor Raúl Manuel Esteves Sousa Fangueiro

novembro de 2023

Direitos de autor

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações CC BY-NC-ND

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação de Mestrado implica a finalização de uma etapa da minha vida que apenas foi possível terminar com sucesso devido ao apoio oferecido por todas as pessoas que fazem parte da minha vida.

Desta forma, queria agradecer inicialmente aos meus orientadores, ao Professor Doutor Raúl Fangueiro por todas as condições oferecidas necessárias para a realização com sucesso deste trabalho e em especial à Doutora Diana Ferreira, por todo o apoio, ajuda e orientação que demonstrou durante este ano e por ter acompanhado assiduamente este trabalho.

De seguida, gostaria de agradecer a todos os técnicos de laboratório e professores que me acompanharam e me auxiliaram durante todo o meu percurso académico e se mostraram sempre disponíveis para me ajudar.

Quero agradecer a todas as pessoas que fazem parte do grupo de investigação que se mostraram sempre disponíveis para me ajudar. No entanto, quero agradecer em específico à Sofia Costa, por toda a ajuda prestada durante o ano, por toda a disponibilidade, amabilidade, dedicação e ajuda, mas acima de tudo por toda a paciência demonstrada.

A todos os meus colegas de curso e amigos quero agradecer por toda a ajuda e por todos os bons momentos que vivemos ao longo deste tempo.

Quero acima de tudo agradecer de forma mais efusiva à minha família, por todo o apoio incondicional, por toda a paciência e por todos os bons conselhos que me deram ao longo da vida.

Do fundo do meu coração, um obrigado a todos!

Declaração de integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.
Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 17/11/2023
Assinatura: Marco Filipe Ferreira Pontes

Resumo

Atualmente, existe um crescente interesse por materiais têxteis funcionais, capazes de exibir propriedades adicionais às suas propriedades intrínsecas. Para além disso, é essencial procurar novas fontes de origem natural para a produção de novas fibras. É neste contexto que surge a utilização de compostos derivados de algas para a produção e funcionalização de materiais têxteis, considerando que as algas são um material bastante comum no planeta, ricas em compostos bioativos e cuja produção não é considerada poluente. Ademais, atualmente algumas algas são já consideradas um resíduo cujo reaproveitamento é altamente necessário, visto apresentarem uma proliferação excessiva na costa, prejudicial ao ecossistema marinho.

O alginato de sódio é um biopolímero de origem natural extraído a partir das algas que tem ganho muita importância a nível industrial devido às propriedades que apresenta, como o facto de ser biocompatível, biodegradável e ter um baixo custo. A utilização de alginato de sódio extraído de algas para produção de fibras por *electrospinning* é cada vez mais comum.

O presente projeto de dissertação visou extrair maioritariamente alginato de sódio a partir de algas, recorrendo aos processos o mais sustentável possível. Através da técnica de *electrospinning* foram produzidas fibras com a maior concentração de alginato possível, utilizando também alguns copolímeros.

O processo de *electrospinning* foi otimizado e as fibras obtidas foram caracterizadas através de diferentes técnicas, nomeadamente através de Microscopia Ótica, Espetroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR), Microscopia Eletrónica de Varrimento (FESEM), Análise Termogravimétrica (TGA) e Refletância Difusa do Estado Fundamental (GSDR). Numa fase final, outros compostos bioativos extraídos da biomassa resultante dos processos de extração do alginato foram devidamente separados e caracterizados. As membranas produzidas foram funcionalizadas com estes compostos extraídos, tendo em vista o desenvolvimento de membranas de nanofibras com propriedades antimicrobianas.

Palavras-chave: *Electrospinning*; Algas; Alginato de sódio; Compostos bioativos; Propriedades antimicrobianas.

Abstract

Nowadays, there is an increasing demand for products with multi-functional properties, meaning products that display additional properties besides their intrinsic ones. Furthermore, it is essential to search for new natural sources for new fibre' production.

It is in this context that the use of compounds derived from algae for the production and functionalization of textile materials gains importance, since algae are a very common material on the planet, rich in bioactive compounds and whose production is considered non-polluting. In addition, some algae are already considered waste resulting in a high need for reutilization, as they excessively proliferate on the coast, harming marine ecosystems.

Sodium alginate is a natural biopolymer extracted from algae, which has gained a lot of importance at an industrial level due to its properties, such as the fact that it is biocompatible, biodegradable and has a low cost. The use of sodium alginate extracted from algae in the production of fibres through *electrospinning* is an increasingly common process.

This dissertation project aims to extract mainly sodium alginate from seaweed, using the most sustainable processes available. Resorting to *electrospinning* technique, fibres with the highest concentration of alginate possible were produced using some copolymers.

The *electrospinning* process was optimized, and the fibres obtained were characterized using different techniques, such as optical microscopy, Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR), Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Ground-State Diffuse Reflectance (GSDR).

Finally, other bioactive compounds extracted from the biomass resulting from the alginate extraction processes were properly separated and characterized. The produced electrospun membranes were then functionalized with these extracted compounds, aiming at the development of nanofiber membranes with antimicrobial properties.

Keywords: *Electrospinning*; Algae; Sodium Alginate; Bioactive compounds; Antimicrobial properties.

Índice

1. Introdução 1

1.1. Enquadramento teórico e motivação 1

1.2. Objetivos 2

1.3. Abordagem seguida 3

2. Estado da Arte 4

2.1. Algas 5

2.1.1. Algae blooms 5

2.1.2. Compostos bioativos 7

2.1.3. Alginato 9

2.1.3.1. Propriedades do alginato 9

2.2.1. Estruturas fibrosas à base de alginato aplicadas na área médica 10

2.2.1.1. *Wound dressings* 10

2.2.1.2. Tissue engineering 11

2.2.1.3. Libertação controlada de compostos 13

2.2.1.4. Outras aplicações 13

2.2. Processos de extração 14

2.2.1. Processo de extração convencional 14

2.2.2. Processos de extração mais ecológicos 18

2.2.2.1. Extração assistida por ultrassons 20

2.2.2.2. Extração assistida por micro-ondas 20

2.2.2.3. Extração a alta pressão 21

2.2.2.4. Extração assistida por enzimas 21

2.3. *Electrospinning* 22

2.4. Polímeros auxiliares 23

2.4. Funcionalização das nanofibras 27

3. Materiais e métodos 28
3.1. Materiais 28
3.2. Métodos 29
3.2.1. Processo de extração de alginato 29
3.2.2. Produção de fibras por *electrospinning* 31
3.2.2.1. Processo de otimização dos parâmetros 31
3.2.2.2. Preparação de soluções poliméricas 37
3.2.2.3. Processo de *electrospinning* 37
3.2.3. Funcionalização das fibras produzidas 38
3.3. Métodos de caracterização 40
3.3.1. Rendimento 40
3.3.2. Viscosidade 41
3.3.3. ATR-FTIR 41
3.3.4. TGA 43
3.3.5. XRD 44
3.4. Caracterização de nanofibras produzidas por *electrospinning* 45
3.4.1. Microscopia ótica 45
3.4.2. Microscopia eletrónica de varrimento (FESEM) 46
3.4.3. Ensaios antibacterianos 47
4. Resultados e discussão 49
4.1. Extração e caracterização do alginato de sódio obtido a partir de macroalgas 49
4.1.1. Rendimento 49
4.1.2. ATR- FTIR 50
4.1.3. TGA 51
4.1.4. XRD 53
4.2. Caracterização das fibras e soluções poliméricas 55

4.2.1. Viscosidade 55

4.2.2. Microscopia ótica 55

4.2.3. FESEM 57

4.2.4. ATR-FTIR 58

4.2.5. TGA 59

4.3. Incorporação do extrato etanólico nas nanofibras por *electrospinning* 60

5. Conclusão 63

6. Referências bibliográficas 65

Índice de figuras

Figura 1 - Efeitos de um algae bloom 6
Figura 2 - Formação de cadeia de poli β-D-manuronato e poli α-L-guluronato 9
Figura 3 - Esquema dos processos de extração convencionais 16
Figura 4 - Esquema de montagem de um sistema de electrospinning 22
Figura 5 - Imagens de SEM de nanofibras de alginato de sódio e PEO 26
Figura 6 - Imagens de SEM de nanofibras de alginato de sódio e PEO 27
Figura 7 - Equipamento de electrospinning MECC NF-103 29
Figura 8 - Esquema de extração do processo de extração 30
Figura 9 - Resultados obtidos na deposição por electrospinning e respetivos tempos de deposição 38
Figura 10 - (A) Solução etanólica com resíduos de algas; (B) Resíduos obtidos em pó. 39
Figura 11 - 1º teste de dissolução dos resíduos 39
Figura 12 - Teste de dissolução dos resíduos em etanol 40
Figura 13 - Testes de solubilidade em Metanol (A) e DMSO (B). 40
Figura 14 - Viscosímetro Myr VR3000 utilizado 41
Figura 15 - Equipamento SHIMADZU IRAffinity-1S 43
Figura 16 - Equipamento Hitachi STA 7200. 44
Figura 17 - Equipamento difractómetros Bruker D8 Discover 45
Figura 18 - Microscópio Leica DM750 utilizado. 46
Figura 19 - Equipamento NOVA 200 Nano SEM utilizado. 47
Figura 20 - Espetro de ATR-FTIR de alginato de sódio comercial e extraído. 50
Figura 21 - Gráfico de TGA para a amostra de alginato de sódio comercial. 51
Figura 22 - Gráfico de TGA para a amostra de alginato de sódio extraído. 52
Figura 23 - Gráfico de XRD para ambos os alginatos. 54
Figura 27 - Fibras obtidas com 3% PEO e 3% alginato de sódio 56
Figura 27 - Fibras obtidas com 3% PEO e 3% alginato de sódio 56
Figura 27 - Fibras obtidas com 2,5% PEO e 2,5% alginato de sódio 56
Figura 27 - Fibras obtidas com 2,5% PEO e 2,5% alginato de sódio em condições otimizadas. 56
Figura 28 - Imagens de SEM das membranas de alginato de sódio/PEO produzidas. .. 57
Figura 29 - Histograma de distribuição dos diâmetros das nanofibras produzidas. 58

Figura 30 - Espetro de ATR-FTIR das membranas produzidas. 58
Figura 31 - Gráfico de TGA da membrana produzida. 59

Índice de tabelas

Tabela 1 - Propriedades dos compostos bioativos 8
Tabela 2 - Exemplos de membranas de nanofibras usadas para wound dressings 11
Tabela 3 - Exemplos de membranas de nanofibras usadas para tissue engineering 12
Tabela 4 - Exemplos de membranas de nanofibras para diversas aplicações 14
Tabela 5 - Exemplos de processos de extração convencionais 17
Tabela 6 - Exemplos de métodos de extração inovadores 19
Tabela 7 - Exemplos de membranas de nanofibras com alginato de sódio 25
Tabela 8 - Materiais utilizados 28
Tabela 9 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato comercial 31
Tabela 9 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato comercial (continuação) 32
Tabela 10 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato extraído 33
Tabela 10 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato extraído (continuação) 34
Tabela 10 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato extraído (continuação) 35
Tabela 10 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato extraído (continuação) 36
Tabela 11 - Parâmetros utilizados para a produção das nanofibras. 37
Tabela 12 - Resultados para os ensaios antibacterianos 61

1. Introdução

1.1. Enquadramento teórico e motivação

A procura por novas soluções sustentáveis tem se tornado imperativa num mundo que sofre cada vez mais desafios ambientais e económicos. Neste contexto, devido ao uso excessivo de fibras sintéticas e ao esgotamento progressivo das fontes de origem natural para a produção de fibras, atualmente existe uma forte procura na área têxtil por novas fontes de fibras naturais inesgotáveis e sustentáveis. Sendo assim, a biomassa de algas surge como uma alternativa interessante capaz de suprir as necessidades da indústria têxtil.

As algas apresentam um elevado potencial de aplicação em têxteis, principalmente devido às suas propriedades intrínsecas que poderão ser aplicadas nesta indústria. A produção de algas é rápida e requer relativamente poucos recursos, tornando-as uma fonte de matéria-prima sustentável quando comparadas com a cultura de outras plantas que são convencionalmente utilizadas nesta indústria. Para além disto, as algas são biodegradáveis, apresentam propriedades antibacterianas e antifúngicas e têm a capacidade de serem utilizadas como corantes naturais.

No entanto, atualmente as alterações climáticas que o planeta está a sofrer, estão a induzir num aumento descontrolado das populações de algas, resultando em *algae blooms*, que não só se tornam desagradáveis para o ser humano, como prejudicam seriamente a fauna e a flora aquáticas. Deste modo, torna-se imperativo investigar novos métodos eficazes de aproveitamento destes materiais.

O presente estudo aborda a utilização de algas para a produção de novas fibras têxteis, baixando o impacto ambiental da produção das fibras e utilizando materiais renováveis. Deste modo, foi abordada a extração de alginatos das algas, sendo que estes são polímeros naturais, muito utilizados nas indústrias farmacêuticas, biomédicas e na indústria alimentar.

Neste contexto, torna-se necessário estudar e otimizar os processos de extração dos alginatos a partir de algas, de forma a conseguir reduzir o impacto ambiental dos mesmos e, se possível, aumentar os rendimentos deste processo de forma a torná-lo o mais apetecível possível a nível industrial.

Para a produção das fibras utilizando estes compostos irá ser abordada a técnica de *electrospinning*, pois é uma das tecnologias mais utilizadas para a produção de fibras utilizando alginatos, para além de apresentar diversas vantagens, como o facto de permitir a produção de fibras à nanoescala, que por si só apresenta diversas vantagens, é uma tecnologia que permite

controlar o tamanho e a morfologia das fibras, permite utilizar uma vasta gama de materiais e pode ser escalável para o nível industrial.

Este trabalho analisa a capacidade das fibras produzidas a partir de algas para o desenvolvimento de têxteis antimicrobianos, podendo oferecer soluções inovadoras para aplicações na área da saúde.

Para além dos alginatos, as algas apresentam uma vasta gama de compostos com propriedades bioativas, que poderão ser aproveitados para a funcionalização de materiais têxteis, de forma a conceder-lhes propriedades adicionais, de forma a torná-los têxteis funcionais.

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho consiste no aproveitamento da biomassa de algas para a produção de novas fibras por *electrospinning* com propriedades antimicrobianas.

Inicialmente, vários processos de extração do alginato de sódio foram otimizados utilizando a alga *Laminaria Ochroleuca*, que foi, por sua vez, utilizado para produzir fibras. No entanto, o processo de extração do alginato descrito na literatura apresenta um rendimento muito baixo e as formulações desenvolvidas para a produção de fibras por *electrospinning* exibem percentagens de alginato muito reduzidas. Segundo (Feng et al., 2015), este biopolímero não apresenta a capacidade de formar fibras por *electrospinning* por si só, necessitando de um polímero adicional; contudo, esta adição reduz consideravelmente a percentagem de alginato que se consegue incorporar nas fibras.

Seguidamente, o alginato extraído juntamente com outros biopolímeros foi utilizado para a produção de fibras por *electrospinning*, onde todos os parâmetros foram otimizados de forma que as fibras produzidas apresentassem uma morfologia o mais uniforme possível e que fossem de fácil produção.

A biomassa restante dos processos de extração do alginato foi incorporada nas soluções poliméricas utilizadas para a produção das membranas de nanofibras por apresentar propriedades possivelmente vantajosas para as fibras, tendo então sido utilizada para funcionalização.

De seguida, a atividade antimicrobiana dos extratos resultantes do processo de extração foi avaliada, bem como a atividade antimicrobiana das membranas de nanofibras que foram produzidas, antes e depois de serem funcionalizadas.

Desta forma, o objetivo do trabalho consiste em tirar proveito das algas para a produção de fibras, extraindo alginato de sódio, e otimizar o método de *electrospinning*, procurando

aumentar a percentagem de alginato que se consegue incorporar. As membranas de nanofibras produzidas através desta abordagem têm em vista a utilização em curativos para feridas ou queimaduras.

1.3. Abordagem seguida

Tendo em conta os objetivos do trabalho foram ser seguidas algumas abordagens para a realização da dissertação, começando pela extração de alginato proveniente das algas, sendo que depois de realizado este processo os alginatos extraídos foram utilizados para a produção por *electrospinning* de membranas fibrosas de alginato de sódio.

No entanto, tal como foi referido anteriormente o alginato não tem a capacidade de produzir fibras sozinho, necessitando de um polímero auxiliar que tenha a capacidade de produzir fibras pela tecnologia de *electrospinning*. Posto isto, depois de alguma pesquisa foi possível perceber que um polímero que apresenta resultados positivos seria o óxido de polietileno de elevado peso molecular, sendo o *electrospinning* de alginato juntamente com este polímero uma das abordagens que foi explorada, onde se produziu membranas com o teor de alginato mais elevado possível.

Para além destas abordagens, também foi estudada a possibilidade de extração de outros compostos das algas que terão propriedades adicionais, como por exemplo, propriedades antimicrobianas, que poderão ser impregnados nas membranas de nanofibras obtidas através de *electrospinning* de modo a conferir funcionalidade ao produto final de forma a tornar o processo de aproveitamento de resíduos de algas ainda mais interessante do ponto de vista ecológico e económico.

2. Estado da Arte

A indústria têxtil é das indústrias mais poluentes devido ao facto de ser das indústrias com maior consumo de produtos químicos e de água, pois qualquer produto têxtil que seja produzido através de materiais sintéticos implica uma utilização elevada de produtos químicos. Desta forma, é necessária a implementação de novos métodos mais ecológicos e possíveis de escalar para o nível industrial (Kant, 2012).

Assim sendo, a utilização de materiais naturais na indústria têxtil é vista como uma das possibilidades de redução do impacto ambiental desta indústria. No entanto, é também necessário compreender que apenas a utilização de materiais naturais não apresenta uma solução viável para a redução deste impacto ambiental, porque é necessário ter em atenção as condições em que estes materiais são obtidos e produzidos, pois a produção destes materiais quando aplicada em massa pode também ter um impacto ambiental negativo. Por exemplo, a fibra de algodão, que é a fibra natural mais usada no planeta, tem um processo produtivo com consumos de água elevadíssimos, por exemplo, para produzir 1 quilograma algodão são necessários aproximadamente 10 000 L de água doce, algo que faz com que o facto de esta fibra ser natural, simplesmente não torne este processo ecológico (Chapagain et al., 2006).

Tendo tudo isto em conta, é necessário encontrar novas fontes de fibras naturais e tornar comum a utilização de materiais cujo processo produtivo não se torne tão poluente. Neste contexto surge a ideia de utilização de algas, que são um material que atualmente existe em grande quantidade na natureza, podendo até tornar-se num problema ambiental devido ao facto de estarem a surgir na costa elevadas quantidades de algas que são consideradas resíduos.

Desta forma, a utilização de algas para a produção de novas fibras torna-se uma abordagem bastante interessante, pois combina o aproveitamento destes resíduos com algumas propriedades vantajosas para a saúde intrínsecas a estes materiais, por exemplo o facto de estes materiais serem biocompatíveis, biodegradáveis e apresentarem propriedades terapêuticas. (R. L. Chapman, 2013).

2.1. Algas

As algas podem ser subdivididas em micro e macroalgas. As microalgas são organismos que podem ser encontrados tanto em água doce como em água salgada e podem ser classificados como eucariotas ou procariotas (no caso das cianobactérias) (V. J. Chapman & Chapman, 1973). Estes microrganismos realizam a fotossíntese e são caracterizados pelo seu curto período de desenvolvimento e crescimento exponencial em condições ambientais favoráveis (R. L. Chapman, 2013; Vale, 2020).

Relativamente às macroalgas, estas são organismos eucarióticos multicelulares, cujo tamanho pode variar desde milímetros até metros. Podem dividir-se tendo em conta os tipos de pigmentos que produzem, sendo os principais grupos as algas castanhas (*Phaephyceae*), as algas verdes (*Chrorophyceae*) e as algas vermelhas (*Rhodophyta*). As algas de grupos diferentes têm composições diferentes e, como tal, poderão ter aplicações distintas (Cao et al., 2021; R. L. Chapman, 2013).

Nos dias que correm, existe uma elevada quantidade de algas invasivas que estão a proliferar de forma excessiva e a afetar o ecossistema marinho. Normalmente as algas são um organismo benéfico para o meio ambiente, pois para além de realizarem o processo de fotossíntese e de serem os maiores produtores de oxigénio do planeta, quando presentes nos oceanos, fornecem um habitat flutuante para determinados organismos marinhos.

No entanto, quando as algas dão à costa em elevadas quantidades, tornam-se um problema ambiental de elevado risco, pois, para além de se tornar desagradável para turistas em termos paisagísticos, impossibilitam o normal funcionamento do habitat para os seres vivos (Maréchal et al., 2017).

Estes fenómenos de proliferação excessiva são conhecidos como *algae blooms*, que consistem na acumulação de fitoplâncton, macroalgas ou microalgas em corpos de água. Tem sido reportado que estes acontecimentos têm vindo a aumentar em frequência (Sellner et al., 2003).

2.1.1. Algae blooms

Os *algae blooms* podem acontecer devido a diversos fatores; no entanto, as atividades antropogénicas e o aquecimento global são dos fatores que se consideram de maior importância (Marampouti et al., 2020). Estes *algae blooms* ocorrem devido à eutrofização dos corpos de água, ou seja, ao aumento dos nutrientes disponíveis nos corpos de água em questão, que os torna

propícios ao crescimento descontrolado de certos organismos, nomeadamente das algas (Glibert et al., 2005).

Este aumento de nutrientes disponíveis pode acontecer tanto devido ao aquecimento global que o proporciona, como devido às atividades humanas que, ao poluírem as águas, aumentam a quantidade de nutrientes disponíveis nas mesmas (Marampouti et al., 2020).

As agregações destes organismos podem causar diferentes reações na natureza, desde coloração das águas (marés castanhas, verdes, ou até vermelhas), surgimento destas algas em flutuação à superfície e nas costas litorais, tornando difícil o normal funcionamento destes ecossistemas. Contudo, a decomposição destas algas poderá ter consequências ainda maiores nos ecossistemas. Ao serem decompostas por bactérias, originam uma elevada proliferação das mesmas, que irão consumir elevadas quantidades de oxigénio, tornando impossível a sobrevivência de outros organismos como peixes e outros animais marinhos, causando a morte em massa destes. Para além disto, depois da morte dos organismos a sua decomposição irá proporcionar a libertação de grandes quantidades de toxinas para a água poluindo a mesma.

Na Figura 1, é possível verificar os efeitos de um *algae bloom,* que infelizmente originou a morte de uma elevada quantidade de peixes e de outros seres vivos marinhos.



Figura 1 - Efeitos de um *algae bloom*
Fonte: Retirado de: *Algal bloom and its economic impact*, de: I. Sanseverino; D. Conduto; L. Pozzoli; S. Dobrici e T.Lettieri, 2016, Itália, JRC Technical Reports, Direitos de autor: European Union, 2016

Segundo (Hallegraeff et al., 1995), existem diversos tipos de *algae blooms* que diferem tendo em conta as espécies que os causam, podendo ser distinguidos nas seguintes categorias:

- Espécies que produzem descolorações inofensivas – no entanto, em condições excecionais poderão crescer de forma tão densa que causam a morte de organismos marinhos devido à falta de oxigênio dos mesmos;
- Espécies que produzem toxinas potentes que podem ter consequências diretas no ser humano, causando diversas doenças;

- Espécies que não são perigosas para os humanos, mas são perigosas para os peixes e invertebrados aquáticos, pois podem danificar ou entupir as suas guelras, levando à morte dos mesmos.

Tendo tudo isto em conta, é absolutamente necessário aproveitar os resíduos das algas provenientes destes *algae blooms*, pois são materiais ricos em propriedades e nutrientes; no entanto, são normalmente aproveitados para fertilização de terrenos, tornando-se num aproveitamento muito básico para um material tão importante como este.

Neste contexto, torna-se imperativo encontrar uma solução de *up-scaling* destes resíduos, de forma a conferir-lhes um valor acrescentado para a sociedade.

Uma das opções mais interessantes será o aproveitamento destes resíduos para a utilização na indústria têxtil, pois as algas poderão ser utilizadas para a produção de fibras ecológicas inovadoras e funcionais, dadas as propriedades distintas que os seus constituintes apresentam, como antimicrobianas, antioxidantes ou anti-inflamatórias.

Genericamente, algas castanhas podem ser constituídas por cerca de 50 % de peso seco de alginatos, que poderão ser usados para a produção de novas fibras. Aproximadamente 6 % de peso seco destas algas poderão ainda ser constituídas por celulose, que poderá ser usada para diversas funcionalizações e, para além destes, as algas apresentam componentes como os carotenoides ou as clorofilas que também poderão acrescer propriedades aos têxteis (Bonefeld, 2019).

Desta forma, é com clareza que se percebe que a utilização de algas para a fertilização de solos, apesar de ser vantajosa para a natureza, é desperdício, pois estes resíduos apresentam potencial para aplicações tecnológicas bastante valiosas e que acrescentam valor a estes desperdícios.

2.1.2. Compostos bioativos

As algas marinhas são uma possível fonte de diversos componentes bioativos que poderão ter propriedades bastante interessantes quando aplicados em materiais têxteis. Alguns dos compostos bioativos que podem ser encontrados nas algas são: ácidos gordos polinsaturados (PUFA´s); vitaminas; carotenoides; polifenóis; polissacarídeos (como os alginatos); proteínas; compostos naturais que promovem o crescimento de plantas, como auxinas, giberelinas e citoquininas. Estes compostos podem ter diversas propriedades, desde propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias e anti tumor, conferindo,

portanto, um elevado potencial de aplicação a nível industrial (Ibañez et al., 2012; Michalak & Chojnacka, 2015).

Algumas das propriedades que podem ser obtidas através de cada composto estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades dos compostos bioativos
Retirado de *Algae as production systems of bioactive compounds,* de: I. Michalak; K. Chojnacka, 2014, Engineering in Life Sciences, 160-176. Direitos de autor: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. 2015

Propriedades dos compostos:	Compostos extraídos:
Antibacterianos	Proteínas
	Polifenóis
	Polissacarídeos
	Pigmentos (clorofilas e carotenoides)
	PUFAs
Antifúngicos	PUFAs
	Pigmentos (clorofilas e carotenoides)
	Terpenos
	Fenóis
Antioxidantes	Proteínas
	Aminoácidos (do tipo micosporina)
	Polifenóis
	Glutationa
	Polissacarídeos
	PUFAs
	Carotenoides
	Ascorbato
	Tocoferol
Anti-inflamatórios	Proteínas
	Carotenoides
	Polissacarídeos
	Fucosterol
	Florotaninos
	Derivados de porfirina
Anti-tumorais	Polifenóis
	Carotenoides
	Polissacarídeos
Antivirais	Proteínas
	Diterpenos
	Polifenóis
	Polissacarídeos
	Carotenoides

2.1.3. Alginato

Os alginatos são polissacarídeos bastante comuns na natureza, encontrando-se como componentes estruturais em algas castanhas (*Phaeophyceae*) marinhas, e na forma de polissacarídeos capsulares em algumas bactérias presentes no solo. Nas algas castanhas os alginatos têm uma função biológica estrutural, ou seja, a matriz de gel de alginato intercelular confere às plantas tanto resistência mecânica como flexibilidade (Draget, 2009).

Deste modo, é necessário compreender que os alginatos são glicuronanos (1-4) ligados não ramificados, compostos por resíduos de ácido β-D-manosilurónico e pelo ácido α-L-gulosilurónico. No entanto, apesar de estes dois ácidos apresentarem apenas ligeiras diferenças a nível estrutural, estes irão adotar diferentes formas (β-D-manuronato e α-L-guluronato, (Figura 2), para que o grupo carboxilo se encontre na posição mais favorável a nível energético (Gacesa, 1987; Taemeh et al., 2020).

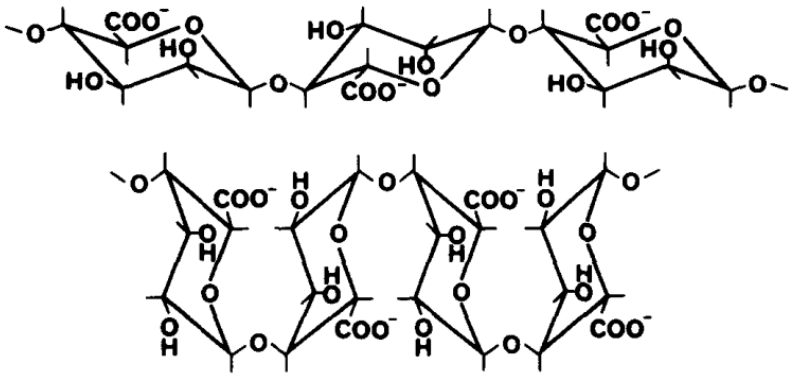


Figura 2 - Formação de cadeia de poli β-D-manuronato e poli α-L-guluronato
Retirado de: Alginates, de: P. Gacesa, 1987*, Carbohydrate Polymers* 8 161-182, Direitos de autor: 1988 por Elsevier Applied Science Publishers Ltd

2.1.3.1. Propriedades do alginato

O alginato de sódio é um polissacarídeo natural derivado de algas que demonstra fortes propriedades de gelificação, elevada biocompatibilidade e grande facilidade de processamento e modificação, sendo por isto usado como biomaterial para bastantes aplicações, incluindo tecidos artificiais, sistemas de administração de medicamentos e curativos.

Segundo (Goh et al., 2012; Izawa et al., 2013; K. Y. Lee & Mooney, 2012; Peng et al., 2012), este polímero pode ser utilizado como uma matriz para encapsulação de compostos,

tornando-se bastante útil para a libertação controlada de compostos, tendo a capacidade de absorver entre 200 a 300 vezes o seu peso em água (Gardner, 2004). Desta forma, quando em contacto com humidade, tem a capacidade de intumescer, libertando as moléculas e os compostos que foram encapsulados no seu interior (Sachan et al., 2009).

O alginato de sódio é também uma das matrizes preferenciais para aplicações de curativos ou compressas para feridas, pois apresenta propriedades de cicatrização, tornando-se ideal para este tipo de aplicações (Dantas et al., 2011; Kim et al., 2008). A propriedade de cicatrização ocorre devido ao facto de os alginatos ativarem os macrófagos humanos, gerando um sinal pro-inflamatório na ferida, que potencia e facilita a cicatrização (Thomas et al., 2000).

No entanto, os alginatos não apresentam propriedades antimicrobianas inerentes, que são das propriedades mais interessantes para curativos, pois fornecem uma barreira que impede o crescimento de microrganismos indesejados. A contaminação de uma ferida por bactérias pode atrasar o processo de cicatrização, podendo também resultar em maus-cheiros e aumentar o desconforto sentido durante este processo (Abdelrahman & Newton, 2011). Desta forma, de maneira a contrariar esta possibilidade, os curativos com alginato de sódio poderão ser funcionalizados com aditivos de forma a torná-los antimicrobianos. Desta maneira, podem ser utilizados aditivos, tanto orgânicos como inorgânicos, como por exemplo extratos naturais ou óleos essenciais, que poderão melhorar ainda mais as aplicações médicas e farmacêuticas destes curativos, bem como a aplicação *in vivo* dos mesmos (Liakos et al., 2014).

2.2.1. Estruturas fibrosas à base de alginato aplicadas na área médica

Tal como já foi referido previamente, os alginatos são um dos polímeros mais interessantes para a produção de nanofibras inovadoras utilizando a técnica de *electrospinning*. Segundo (Taemeh et al., 2019), já tem sido estudada a utilização deste tipo de nanofibras de alginato para diversas aplicações na área médica, sendo que algumas das mais comuns são: *wound dressings*, ou curativos ativos; engenharia de tecidos (*tissue engineering*) e a libertação controlada de compostos.

2.2.1.1. *Wound dressings*

De acordo com (Aderibigbe & Buyana, 2018), os curativos produzidos à base de alginatos são comercialmente utilizados para feridas com hemorragias, principalmente devido à sua capacidade de remoção sem trauma e dor, rápida granulação e revitalização, bem como capacidade para absorver grandes quantidades de exsudato das feridas.

Vários estudos indicaram um efeito positivo quando se utiliza um curativo de nanofibras para o processo de cicatrização de feridas. Segundo (Wnek et al., 2003), este tipo de curativos absorve uma grande quantidade de exsudado das feridas, o que é positivo em comparação com outros tipos de curativos onde tal não acontece.

Os curativos de nanofibras também mantêm a ferida húmida e diminuiem a probabilidade de infeções provenientes de bactérias e permitem a penetração de gases (Khil et al., 2003).

Para além destas vantagens, no momento de produção das membranas de nanofibras existe a possibilidade de incorporar agentes antibacterianos nas mesmas de modo a aumentar as propriedades destes curativos de forma a torná-los o mais eficazes possíveis. Na tabela 2 estão apresentados alguns exemplos de trabalhos onde isso foi realizado.

Tabela 2 - Exemplos de membranas de nanofibras usadas para *wound dressings*
Acervo próprio

Referência:	Processo utilizado:
(Kong et al., 2008)	Foram criadas membranas de nanofibras antibacterianas, onde se adicionou coloides de prata a uma solução de alginato de sódio.
(Mokhena & Luyt, 2017)	Foi realizado um *coating* de nanopartículas de prata com quitosano a uma membrana de nanofibras de alginato de forma a conceder uma elevada atividade antibacteriana às membranas.
(Kataria et al., 2014; Kyzioł et al., 2017)	Foi incorporada ciprofloxacina nas membranas de alginato de sódio, com a função de agente antibiótico, de forma a conceder propriedades antibacterianas.
(Tang et al., 2019)	Neste trabalho utilizou-se mel numa membrana de alginato de sódio com PVA, onde se verificou um aumento da atividade antioxidante das mesmas com o aumento da quantidade de mel.

2.2.1.2. Tissue engineering

Nos dias que correm está a existir um aumento no interesse relativamente a nanofibras para utilização em *tissue engineering,* pois estas nanofibras podem ser produzidas à medida para

replicar a matriz celular desejada, tanto em estrutura, como composição química e propriedades mecânicas (W. J. Li et al., 2002).

Recentemente, a produção de nanofibras utilizando biopolímeros naturais tem gerado muito interesse para a produção de *scaffolds* devido às suas propriedades biológicas adequadas (Hsu et al., 2004).

Dentro dos biopolímeros utilizados para esta finalidade o alginato de sódio tem ganho alguma relevância para a produção de scaffolds para osso (Chae et al., 2013a), para a pele (Hashimoto et al., 2004) e para a regeneração de cartilagem (Z. Li & Zhang, 2005)

Alguns exemplos dos trabalhos que têm sido realizados para a utilização de membranas de nanofibras de alginato de sódio para aplicar em *tissue engineering* estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Exemplos de membranas de nanofibras usadas para *tissue engineering*
Acervo próprio

Referência:	Processo utilizado:
(C. C. Yu et al., 2013)	Fabricaram um *scaffold* de nanofibras utilizando alginato, quitosano, colagénio e hidroxiapatite, que promove o crescimento de células
(Rafienia et al., 2017)	Foi adicionada cerâmica de bio-vidro numa membrana de nanofibras de PVA com alginato de sódio, onde se verificou a formação de hidroxiapatite, um dos componentes mais importantes do tecido ósseo.
(Chae et al., 2013)	Neste trabalho demonstraram que a presença de hidroxiapatite em estruturas fibrosas de hidroxiapatite/alginato leva à fixação estável de células osteoblásticas quando em comparação com estruturas de alginato puro.
(R. T. De Silva et al., 2018)	Foram produzidos *scaffolds* baseados em nanofibras de alginato de sódio, onde foram incorporados nanotubos de halloysite, que resultou em membranas com libertação dos compostos e com elevadas propriedades antibacterianas, podendo ser utilizado para aplicações para regeneração de pele.

2.2.1.3. Libertação controlada de compostos

Tal como já foi referido por (Sachan et al., 2009) e no presente trabalho, o alginato de sódio é um biopolímero com a capacidade de absorver água, inchando e libertando controladamente os compostos que se pretendam.

Assim sendo, torna-se possível utilizar a capacidade de libertação de compostos para aplicações na área médica, pois podem ser produzidas membranas de nanofibras impregnadas com agentes antibióticos ou antibacterianos, que previnem a formação de infeções em feridas, tornando então estes materiais muito interessantes para esta área.

Desta forma, já têm sido realizados diversos trabalhos onde se produzem membranas de nanofibras à base de alginato de sódio para libertação controlada de compostos.

(Kataria et al., 2014) desenvolveram uma membrana de nanofibras de alginato de sódio com PVA, incorporadas com ciprofloxacina, tendo a capacidade de libertar controladamente este composto. Concluíram que a aplicação destas membranas permitiu reduzir os tempos de cicatrização em feridas.

(Wongkanya et al., 2017) realizaram um estudo, onde se produziram fibras de alginato de sódio e PEO, nas quais se incorporou proteína de soja para encapsular um composto antibiótico; verificou-se que estas nanofibras permitiram aumentar o tempo de libertação do antibiótico, bem como aumentar a biocompatibilidade das próprias fibras.

2.2.1.4. Outras aplicações

Para além das aplicações abordadas anteriormente, as nanofibras à base de alginato podem ser utilizadas em vários setores para além da área biomédica; alguns exemplos destas aplicações são os biossensores e materiais absorventes de poluição (Tabela 4).

Tabela 4 - Exemplos de membranas de nanofibras para diversas aplicações

Referência:	Processo utilizado:
(W. P. Hu et al., 2017)	Produziram uma membrana de nanofibras de alginato de sódio com nanopartículas de prata capaz de monitorizar a respiração humana, para além de apresentar propriedades antibacterianas.
(Mokhena & Luyt, 2017)	Foram produzidas nanofibras de alginato com a capacidade de purificar água, bem como separar tintas e óleos da mesma.
(Zhang et al., 2018)	Produziram um sensor de humidade, capaz de se conectar a uma máscara para monitorizar a respiração humana durante exercício físico ou até mesmo mudanças de humor.

2.2. Processos de extração

2.2.1. Processo de extração convencional

A extração de alginato de sódio utilizando processos convencionais geralmente é composta por 5 etapas distintas. As algas, depois de serem pré-tratadas, são submetidas a processos de tratamento ácido, geralmente utilizando ácido clorídrico, extração alcalina, separação sólido-líquido, precipitação, secagem e, por fim, o alginato de sódio pode ser moído até se obter um pó fino, de forma a facilitar a dissolução deste para as aplicações pretendidas (Hernández-Carmona et al., 2013; Peteiro, 2018).

O processo de extração de alginato de sódio consiste na transformação de todos os sais de alginato presentes nas algas em alginato de sódio solúvel, solubilização do alginato em água e remoção dos compostos não-solúveis. Após esta etapa, este polímero é transformado em ácido algínico através do tratamento em ácido hidroclorídrico. O ácido algínico é então triturado e colocado em álcool e carbonato de sódio, de forma que este seja convertido em alginato de sódio.

O processo de extração alcalina é dos mais importantes, pois é o processo responsável por conferir as propriedades físico-químicas aos alginatos; no entanto, segundo (Mohammed et al., 2020) pode também ser necessário realizar um processo de branqueamento, dependendo do uso final pretendido.

A biomassa de algas pode ser pré-tratada antes de ser realizado o processo de extração através de diferentes métodos; podem ser utilizados métodos químicos, como a acidificação, mas também podem ser implementados processos físicos. Antes de se realizar o processo de extração,

é então necessário ter em atenção alguns parâmetros – por exemplo, a biomassa utilizada tem de conter pelo menos 83% de matéria seca (ou apenas 17% de humidade), sendo que também é necessário ter em atenção que o material a usar não pode conter mais de 3% de resíduos, como areia (Łabowska et al., 2019).

O tamanho do material também tem influência os resultados obtidos pois, segundo (Łabowska et al., 2019), quanto mais pequenas forem as partículas do material de onde se pretende extrair os alginatos, maior será a quantidade de alginato obtida, o que pode ser justificado pelo aumento da área de superfície.

No entanto, não existe um processo de extração convencional que esteja definido, podendo sofrer diversas variações que podem influenciar várias características do alginato de sódio obtido, como diferentes pesos moleculares.

Na Figura 3 está representado o esquema do processo de extração de alginato de sódio e as variações mais realizadas na indústria e abordadas na literatura.

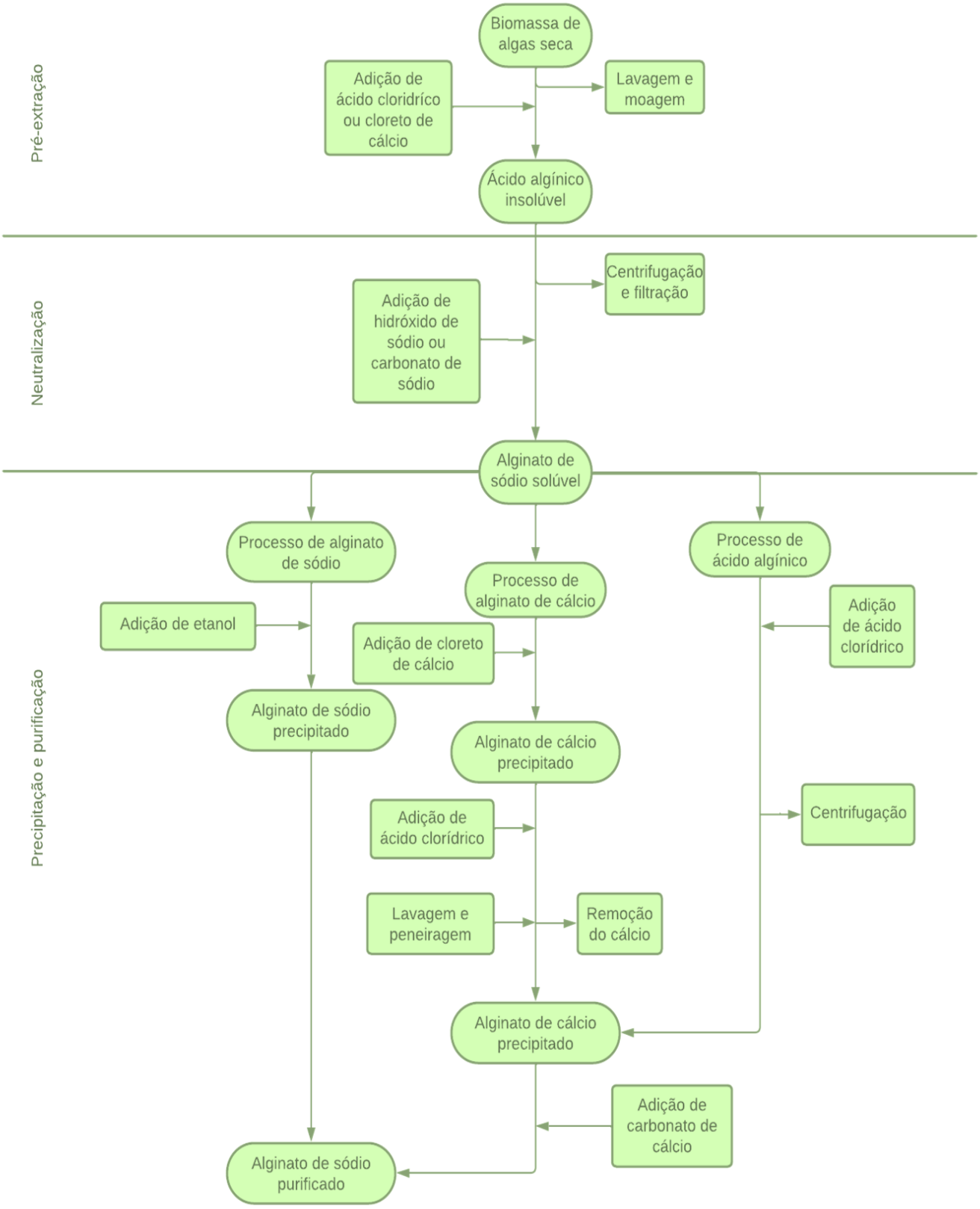


Figura 3 - Esquema dos processos de extração convencionais
Adaptado de: Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties; de: H. Bojorges; A. López-Rubio; A. Martínez-Abad e M. J. Fabra, 2023, *Trends in Food Science & Technology* 140, Elsevier Ltd.
Direitos de autor: 2023 H. Bojorges; A. López-Rubio; A. Martínez-Abad e M. J. Fabra

O facto de existir uma ampla variedade de métodos de extração de alginato de sódio reconhecidos como métodos convencionais, diferentes rendimentos de extração resultarão do processo. Posto isto, na Tabela 5 é possível encontrar alguns exemplos de rendimentos obtidos para diferentes processos de extração convencionais.

Tabela 5 - Exemplos de processos de extração convencionais

Adaptado de: Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties; de: H. Bojorges; A. López-Rubio; A. Martínez-Abad e M. J. Fabra, 2023, *Trends in Food Science & Technology* 140, Elsevier Ltd. Direitos de autor: 2023 H. Bojorges; A. López-Rubio; A. Martínez-Abad e M. J. Fabra

Espécie de macroalga utilizada	Condições de extração	Rendimento obtido (%)	Referência
Nizimuddinia zanardini	0,2 M HCl, durante 3h a 60 °C 3 % Na_2CO_3, durante 2,5 h a 60 °C	24,0	(Khajouei et al., 2018)
Sargassum vulgare	0,1 M H_2SO_4, pH < 2, 3 h. 0,5 M Na_2CO_3, durante 3 h a 50 °C	40,0	(Sari-Chmayssem et al., 2016)
Macrocystis pyrifera	0,1 N HCl, 30 min 0,5 % Na_2CO_3, durante 1 h a 60 °C	23,2	(Gao et al., 2018)
Sargassum natans	0,2 M HCl, 2% Na_2CO_3, durante 3 h a 99 °C	23,0	(Rhein-Knudsen et al., 2017)
Sargassum vulgare		17,0	
Padina gymnospora		16,0	
Padina antillarum		22,0	
Laminaria digitata		29,0	
Macrocystis pyrifera		26,0	
Laminaria digitata	0,2 M HCl, 24 h 2 % Na_2CO_3, 5 h a 40 °C	51,8	(Fertah et al., 2017)
Cystoseira barbata	1,1 M HCl, pH 2, 2 h a 60 °C 3 % Na_2CO_3, pH 11, 2 h a 6 °C	9,9	(Sellimi et al., 2015)
Sargassum aquifolium	0,01 M HCl, 2 % $CaCl_2$ a 70 °C	39,0	(Setyawidati et al., 2018)
Padin boryana		6,2	
Turbinaria decurrens		38,7	
Laminaria digitata	4 % Na_2CO_3, 20 °C	38,8	(Vauchel et al., 2009)
Sargassum natans	5 % Na_2CO_3, rácio alkali:alga (15:1), 2 h a 65 °C	15,0	(Mohammed et al., 2018)
Colpomenia peregrina	0,1 M HCl, pH 2, durante 3 h a 65 °C	8,0	(Rostami et al., 2017)

Dictyopteris membranaceae	2 % $CaCl_2$ durante 3 h, 1 M Na_2CO_3 durante 2 h	18,9	(Deghrigue Abid et al., 2019)
Padina pavonica		66,7	
Durvillaea antarctica	0,2 M HCl, 3 h a 60 °C	20,8	(Caballero et al., 2021)
Macrocystis pyrifera	3 % Na_2CO_3 durante 2,5 h a 60 °C	18,0	
Lessonia nigrescens		12,5	
Sargassum wightii	0,4 M HCl, 2 h a 20 °C		(Janarthanan & Senthil Kumar, 2019)
Padina tetrastromatica	4 % Na_2CO_3		
Ascophyllum nodosum	0,2 M HCl, 12 h a temperatura ambiente	13,8	(Bojorges et al., 2022)
Saccharina latissima	0,1 M $NaHCO_3$ durante 2 h a temperatura ambiente	1,2	
Sargassum turbinaroides	0,2 M HCl, 24 h 2 % Na_2CO_3 durante 3 h a 100 °C	10,0	(Laroche et al., 966)
Laminaria ochroleuca (folha)	0,2 M HCl, 24 h 2 % Na_2CO_3, 24 h	28,96	(Kaidi et al., 2022)
Laminaria ochroleuca (caule)	0,2 M HCl, 24 h 2 % Na_2CO_3, 24h	49,80	

No entanto, o processo de extração convencional, como utiliza ácidos muito fortes e temperaturas altas em algumas das etapas, torna-se um processo com um impacto ambiental negativo considerável. Desta forma, existem já diversos estudos que desenvolvem abordagens menos prejudiciais para o meio-ambiente.

2.2.2. Processos de extração mais ecológicos

Tendo em conta que o método convencional para a extração dos alginatos é considerado bastante poluente, atualmente têm sido abordados diversos métodos diferentes para reduzir este impacto ambiental.

Uma das hipóteses para a redução deste impacto é a substituição dos solventes utilizados convencionalmente, como HCl e formaldeído, por outros mais fracos e, consequentemente, menos tóxicos, como o ácido cítrico. A utilização deste ácido em particular apresenta algumas vantagens,

como o facto de promover a troca de iões necessária para converter o alginato em ácido algínico insolúvel (Fawzy et al., 2017).

Por outro lado, já foram estudadas diversas formas de extração mais sustentáveis (Tabela 6), sendo alguns exemplos destas técnicas a extração assistida por ultrassons, a extração assistida por micro-ondas, a extração assistida por enzimas e a extração a alta pressão (Bojorges et al., 2022; Saji et al., 2022).

Tabela 6 - Exemplos de métodos de extração inovadores
Adaptado de: Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties; de: H. Bojorges; A. López-Rubio; A. Martínez-Abad e M. J. Fabra, 2023, *Trends in Food Science & Technology* 140, Elsevier Ltd. Direitos de autor: 2023 H. Bojorges; A. López-Rubio; A. Martínez-Abad e M. J. Fabra

Processo de extração	Macroalga utilizada	Condições de extração usadas	Rendimento obtido (%)	Referência
Extração assistida por ultrassons	*Sargassum bideri*	Água, 10:1 (v/w), 150 W, pH 11, 30 min a 90 °C	27,0	(Youssouf et al., 2017)
	Sargassum muticum	Água, 20:1 (v/w), 150 W, 50 Hz, 5 min	5,7	(Flórez-Fernández et al., 2019)
Extração assistida por microondas	*Ascophyllum nodosum*	0,4 M H_2SO_4, 1 min a 150 °C	18,2	(Yuan & Macquarrie, 2015)
	Saccorhiza polyschide	0,1 M HCl, 2 h a 20 °C	17,8	(M. Silva et al., 2015)
	Nizimuddinia zanardini	HCl a pH 1, 0,2 M Na_2CO_3, 2 h a 45 °C Condições de microondas: 10 min a 45 °C, 400 W	21,2	(Torabi et al., 2022)
	Undaria pinnatifida	Água, 1:30 (w/w), 850 W, 800 rpm, 5 min a 160 °C	4,5	(Queffelec et al., 2021)
Extração a alta pressão	*Ascophyllum nodosum*	0,2 M HCl, 12 h a temperatura ambiente	23,0	(Bojorges, Martínez-Abad, et al., 2023)
	Saccharina latissima	0,1 M $NaHCO_3$ durante 2 h a temperatura ambiente	13,9	
Extração assistida por enzimas	*Colpomenia peregrina*	0,1 M HCl, pH 2, 3 h a 65 °C Enzima: Alcalase (5%), pH 8, 24 h a 50 ◦C	3,8	(Rostami et al., 2017)

	Cystoseira trinodis	Enzima: alginato-liase, 72 h a 28°C Ácido cítrico (2 % w/v), 2 h a 30 °C $NaHCO_3$ (2 % w/v), 3 h a 40 °C	21,8	(Hifney et al., 2018)
	Sargassum angutifolium	Enzima: Alcalase 5 % (w/w), pH 8, 24 h a 50 °C	3,5	(Borazjani et al., 2017)
	Sargassum angutifolium	Enzima: Alcalase 5 % (w/w), pH 4,5, 24 h a 50 °C	3,5	

2.2.2.1. Extração assistida por ultrassons

O processo de extração assistida por ultrassons é considerado um processo sustentável, porque não necessita de grandes volumes de solventes e geralmente apresenta tempos de processamento baixos. É também um processo de fácil manuseamento e que, portanto, é também de fácil escalamento para o nível industrial com um custo relativamente baixo quando comparado com outros processos mais sustentáveis (Bojorges, López-Rubio, et al., 2023).

Este processo baseia-se na utilização de ultrassons para quebrar as paredes celulares, implicando uma redução no tamanho das partículas, aumentando a difusão e a transferência de massa durante a extração, resultando numa maior penetração dos solventes, facilitando assim a extração dos compostos pretendidos.

2.2.2.2. Extração assistida por micro-ondas

O processo de extração assistido por micro-ondas consiste na produção de vibrações que causam um aumento da temperatura dos fluidos intracelulares presentes nas algas. Este aquecimento interno causa um rompimento das paredes celulares, libertando os compostos inerentes às células para o solvente. Desta forma, é possível obter rendimentos superiores, reduzir as quantidades de solventes utilizadas e reduzir os tempos de extração. Adicionalmente, a utilização desta tecnologia permite uma distribuição da temperatura mais uniforme quando comparada com os processos convencionais (Gullón et al., 2020).

Quando comparado com os ultrassons, a utilização de micro-ondas é um método que permite utilizar quantidades ainda mais reduzidas de solventes e que pode aumentar o rendimento do processo (Garcia-Vaquero et al., 2017). Para além disto, este método é mais simples e mais economicamente viável; no entanto o escalamento para o nível industrial ainda necessita de ser desenvolvido.

Apesar de ser um método eficiente para extração de polissacarídeos, a extração assistida por micro-ondas requer maior seletividade, sendo usada apenas para o fracionamento de polissacarídeos. Desta forma, para se extrair seletivamente um polissacarídeo, é necessário combinar este método com outros, ou com outros solventes (Ruiz-Aceituno et al., 2016).

Assim sendo, existem ainda poucos estudos sobre o uso de micro-ondas para a extração de alginato a partir de algas, pois a eficácia deste processo depende de vários fatores (Bojorges, López-Rubio, et al., 2023).

2.2.2.3. Extração a alta pressão

O método de extração utilizando alta pressão consiste na aplicação de altas temperaturas, entre os 20 e os 200 °C, combinadas com pressões elevadas, entre 1 e 20 MPa, no solvente, de forma a mantê-lo no estado líquido abaixo do ponto crítico (Gullón et al., 2020).

Uma das maiores vantagens da utilização deste método é permitir uma elevada eficiência de extração com quantidades de solvente e tempos reduzidos, quando comparado com a extração em condições ambientais. Isto acontece pois a combinação das pressões altas com a temperatura origina maior solubilidade, transferência de massa superior, bem como tensão superficial reduzida nos solventes, o que, por sua vez, promove a penetração do solvente no material, facilitando então a extração dos compostos alvo (Machmudah et al., 2020).

2.2.2.4. Extração assistida por enzimas

Este processo de extração é bastante promissor, pois apresenta uma elevada eficiência e normalmente são utilizadas condições de extração bastante moderadas. As enzimas que se utilizam são de grau alimentar, não são tóxicas e têm um impacto ambiental reduzido, sendo, desta forma, adequadas para operações em grande escala. No entanto, o elevado custo de algumas enzimas impede o escalamento deste método para nível industrial (Garcia-Vaquero et al., 2017; Michalak & Chojnacka, 2014).

No processo de extração de alginatos, as principais enzimas utlizadas são as celulases e as protéases, que são geralmente utilizadas para destruir as paredes celulares das algas, de forma a promover a extração dos alginatos (Charoensiddhi et al., 2017). A escolha das enzimas depende de vários fatores, como o solvente, a temperatura, o pH e a concentração de enzima, e a otimização destes parâmetros influencia diretamente o rendimento da extração (Gomez et al., 2020).

A extração com enzimas oferece diversas vantagens, incluindo alta eficiência de extração, uso reduzido de solventes, consumos de energia e tempos de extração mais reduzidos, resultando em rendimentos superiores aos dos métodos convencionais (Gomez et al., 2020).

Tendo isto em conta, a utilização deste método tem sido abordada como pré-tratamento de algas antes da extração, ou então utilizada em combinação com outras técnicas inovadoras como ultrassons ou micro-ondas (Mena-García et al., 2019; Ummat et al., 2021).

2.3. *Electrospinning*

O *electrospinning* é uma técnica de fiação inovadora, utilizada para a produção de micro ou nanofibras, na qual uma solução polimérica viscosa é forçada através de um campo elétrico, formando uma solução em gotícula, na maior parte dos casos, numa ponta metálica de uma agulha (Mokhena et al., 2020).

As nanofibras obtidas por *electrospinning* apresentam propriedades muito interessantes ao nível do transporte de humidade, convecção de ar, filtração de aerossóis e, para além destas propriedades, apresentam também uma elevada área especifica superficial, uma elevada razão entre o comprimento e a largura das fibras, potencial biomimético e boas propriedades térmicas e mecânicas (Mokhena et al., 2020).

O equipamento de *electrospinning* é geralmente constituído por uma fonte de alta tensão, uma bomba, uma agulha, uma seringa e um coletor, apresentado na imagem seguinte (Figura 4). O coletor pode ter diversas formas, sendo possível usar coletores estáticos, como uma placa metálica plana, ou coletores dinâmicos, como um coletor rotativo. A escolha do coletor irá diferir dependendo do objetivo e da fibra que se pretende produzir (Costa et al., 2022; Z. Li & Wang, 2013).

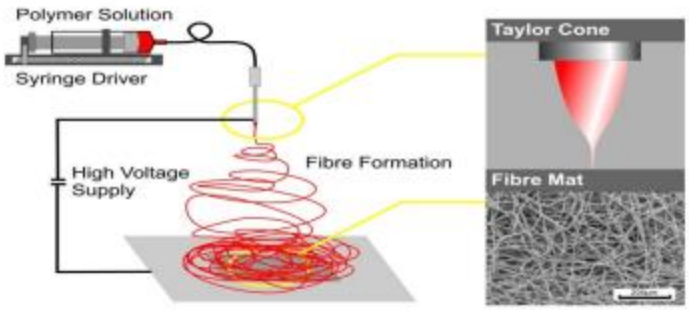


Figura 4 - Esquema de montagem de um sistema de *electrospinning*
Retirado de: Development and Optimization of Chemically-Active Electrospun Nanofibers for Treatment of Impaired Water Sources, de: M. J. Nalbandian, 2014. Direitos de autor: 2014, Michael Jean-Claude Nalbandian

Tal como referido anteriormente, a solução polimérica é submetida a um campo elétrico, que induz carga na superfície da solução, originando forças de repulsão diretamente contrárias à tensão superficial da solução. Desta forma, à medida que a intensidade do campo elétrico aumenta, a superfície da solução na ponta da agulha é alongada, formando uma forma cónica conhecida como o cone de Taylor. Quando o campo elétrico atinge um valor crítico em que as forças repulsivas sobrepõem a força de tensão superficial, é ejetado um jato carregado eletricamente da ponta do cone de Taylor. Como este jato tem carga elétrica, a sua trajetória pode ser controlada através de um campo elétrico. À medida que o jato atravessa o ar, o solvente vai evaporando, deixando apenas uma fibra do polímero com carga elétrica, que se irá depositar de forma aleatória no coletor metálico pretendido (Z. Li & Wang, 2013).

Deste modo, que existem diversos parâmetros que podem influenciar o processo de *electrospinning*, podendo ser parâmetros da solução, parâmetros do processo e até mesmo parâmetros ambientais (Kulkarni et al., 2010). Dentro dos parâmetros da solução estão incluídos a concentração, a viscosidade, o peso molecular, a tensão superficial e a condutividade da mesma. Relativamente aos parâmetros do processo, são incluídos a voltagem usada, a taxa de fluxo, a distância ao coletor e o tipo de coletor utilizado. A temperatura e a humidade também irão influenciar o processo de *electrospinning* e são considerados parâmetros ambientais (Costa et al., 2022; Doshi & Reneker, 1995).

2.4. Polímeros auxiliares

Tal como referido anteriormente, o alginato apresenta diversas propriedades de elevado interesse para aplicações na área têxtil. No entanto, a produção de fibras de alginato através da tecnologia de *electrospinning* apresenta um grande inconveniente – o facto de o alginato não ter a capacidade de produzir fibras diretamente através da tecnologia de *electrospinning*; ou seja, é necessária a incorporação de um polímero auxiliar com essa capacidade, de forma a tornar o processo de formação de fibras viável (Saquing et al., 2013).

No entanto, com o acréscimo de um polímero adicional à solução de *electrospinning*, ocorre a diminuição da quantidade de alginato que se consegue incorporar nas fibras finais, sendo que é defendido que a quantidade máxima de alginato que se consegue incorporar com polímeros convencionais não excede 40 % (Mokhena et al., 2020).

Alguns dos polímeros mais utilizados e mais estudados no processo de *electrospinning* são, por exemplo, o acetato de polivinilo (PVA), o óxido de polietileno (PEO), o ácido poliláctico (PLA) e a policaprolactona (PCL).

De acordo com (Ahmed Al-moalemi et al., 2022), o problema do alginato de sódio não ter a capacidade de produzir nanofibras sozinho deve-se tanto devido à sua elevada viscosidade, como à sua condutividade. Este problema pode ser resolvido através da mistura do alginato de sódio com PEO, pois este último reduz a tensão superficial da mistura polimérica e a viscosidade da mesma.

Para além disto, na solução polimérica podem ainda ser adicionados surfactantes de forma a melhorar a morfologia das nanofibras e de maneira que seja possível aumentar ainda mais a quantidade de alginato das mesmas.

As membranas de alginato e PEO, devido à sua elevada porosidade e rácio volume-superfície, são um material muito promissor para libertação controlada de produtos e são indicadas para a utilização em curativos ou noutros materiais usados em feridas (Ahmed Al-moalemi et al., 2022; H. Lee et al., 2017; D. G. Yu et al., 2009).

(Abrigo et al., 2014; Hajiali et al., 2016) defendem que um curativo ideal deverá ser produzido de forma a não só promover a regeneração completa do tecido ferido, reparar a sua atividade biológica e aparência, bem como minimizar a inflamação e desconforto sentidos, e prevenir infeções provenientes de microrganismos.

As fibras incorporadas com compostos bioativos podem ser uma alternativa interessante para os sistemas de libertação controlada, de forma a reduzir os efeitos colaterais causados pela administração oral dos agentes e fornecer uma reação bastante rápida. Os compostos incorporados em fibras biodegradáveis são libertados controladamente através da degradação do polímero (Mallikarjuna et al., 2013).

Os curativos baseados em alginatos são os mais indicados para a cicatrização de feridas, pois têm uma boa capacidade para criar um ambiente húmido em torno da área desejada, algo que se torna propício para o processo de cicatrização. Para além disso, este tipo de curativos apresenta também a capacidade de libertar compostos bioativos e promover a revitalização e regeneração do tecido humano (K. Y. Lee & Mooney, 2012; Moura et al., 2013; Zahedi et al., 2010).

(Taemeh et al., 2019) produziram membranas de nanofibras com PEO de elevado peso molecular para aplicações biomédicas, encontrando-se na Tabela 7 alguns exemplos de

membranas de alginato de sódio misturado com PEO e PVA. A tabela apresenta também os parâmetros utilizados neste processo, bem como a quantidade de alginato de sódio obtida na membrana final.

Tabela 7 - Exemplos de membranas de nanofibras com alginato de sódio
Adaptado de: *Fabrication challenges and trends in biomedical applications of alginate electrospun nanofibers*, de: M.A.Taemeh, A. Shiravandi, M. A. Korayem e H. Daemi, 2020, *Carbohydrate Polymers* 228. Direitos de autor: 2019 Elsevier Ltd.

Polímero auxiliar	Percentagem de alginato na membrana final (%)	Distância entre a agulha e o coletor (cm)	Voltagem usada (kV)	Taxa de fluxo (mL/h)	Referência
PVA	4,2	15	15	0,5	(Kataria et al., 2014)
	11	5	17	0,1	(Shalumon et al., 2011)
	5,97	-	16-18	-	(Tarun & Gobi, 2012)
	10	10	15	0,4	(Tang et al., 2019)
	20	10	20	0,2	(Sobhanian et al., 2019)
	6,6	17	13,5	0,32	(Ni et al., 2019)
	11,76	15	15	-	(Islam & Karim, 2010)
PEO	25-50	10-12	9-12	0,06-0,36	(Moon et al., 2009)
	33,33	10	13	1,2	(Jeong et al., 2010)
	70	15	12	0,5	(Saquing et al., 2013)
	80	15	20	3	(Nie et al., 2009)
	50	16	0-30	0,4	(C. Hu et al., 2015)

Analisando a tabela, é possível perceber que os valores de alginato de sódio obtidos são muito reduzidos e, em alguns dos trabalhos, são utilizados surfactantes de forma a melhorar a morfologia das nanofibras obtidas. (Saquing et al., 2013) concluíram que com a utilização de PEO com elevado peso molecular foi possível aumentar a quantidade de alginato que se conseguiu incorporar nas fibras. Com a utilização de PEO com 2000 kDa de peso molecular foi possível obter boas fibras usado uma proporção de alginato-PEO de 70/30. Através da análise da Figura 5,

concluiu-se que, com o aumento do peso molecular do PEO utilizado, é possível aumentar a quantidade de alginato possível de incorporar nas membranas.

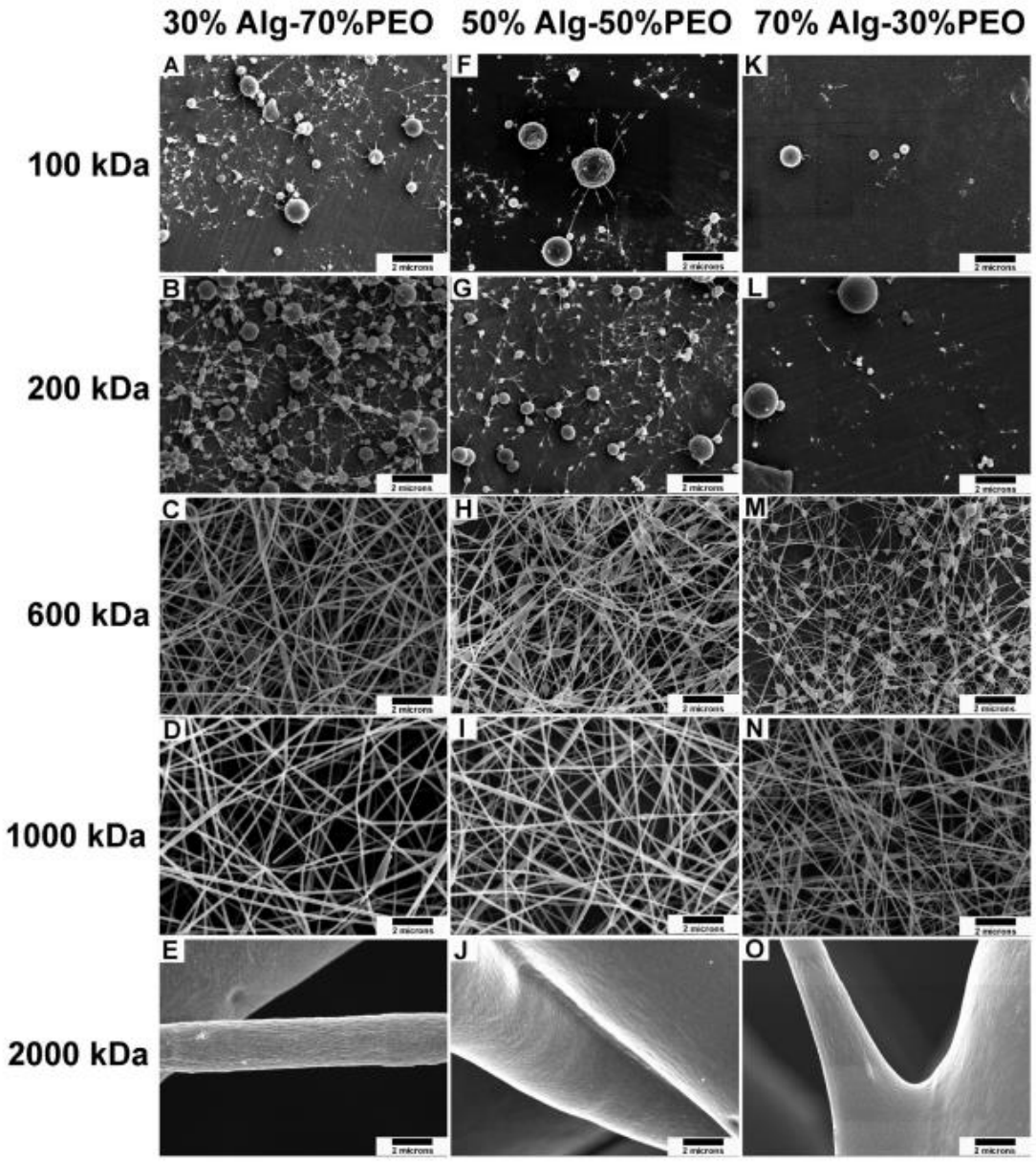


Figura 5 - Imagens de SEM de nanofibras de alginato de sódio e PEO
Retirado de: *Alginate–Polyethylene Oxide Blend Nanofibers and the Role of the Carrier Polymer in Electrospinning,* de: C. D. Saquing; C. Tang; B. Monian; C. A. Bonino; J. L. Manasco; E. Alsberg e S. A. Khan, 2013. Direitos de autor: 2013 American Chemical Society

Segundo (Nie et al., 2009), com a utilização de PEO com 1000 kDa de peso molecular foi possível obter membranas de 80/20 de alginato-PEO; no entanto, apesar de ter sido possível

produzir fibras com estas quantidades de alginato, as fibras obtidas apresentaram um elevado número de gotículas.

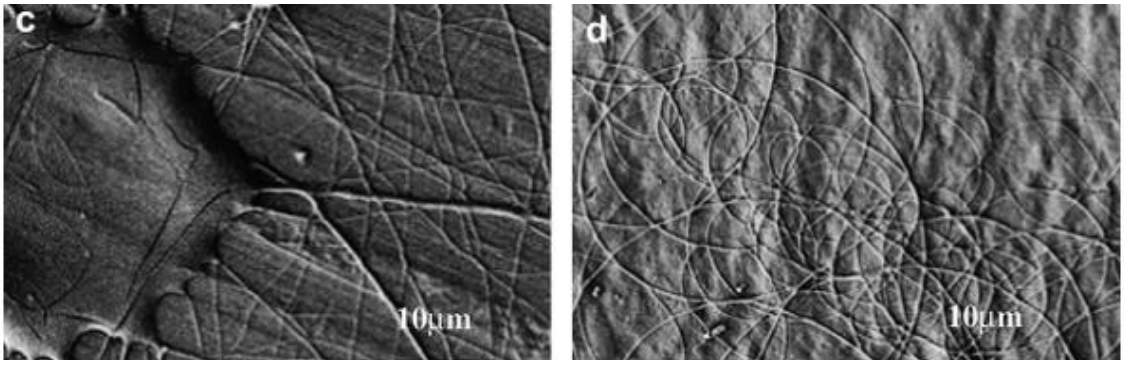


Figura 6 - Imagens de SEM de nanofibras de alginato de sódio e PEO
Retirado de: Effect of poly(ethylene oxide) with different molecular weights on the electrospinnability of sodium alginate de: H. Nie, A. He, W. Wu, J. Zheng, S. Xu, J. Li e C. C. Han, 2009. Direitos de autor: 2009 Elsevier Ltd.

Através da análise da Figura 6 é possível verificar que foram obtidas fibras com 80% de alginato de sódio com sucesso.

Depois de cuidadosamente analisar todos os trabalhos acima apresentados, foi possível perceber que a quantidade de alginato de sódio que é possível incorporar nas nanofibras apresenta valores superiores quando utilizada juntamente com PEO de elevado peso molecular.

2.4. Funcionalização das nanofibras

As nanofibras podem ser funcionalizadas utilizando diferentes processos – através da adição de compostos nas próprias soluções poliméricas, funcionalizadas com compostos encapsulados ou podem até ser revestidas com os compostos pretendidos.

Tal como supramencionado, existe uma ampla gama de compostos bioativos que poderão ser incorporados nas membranas de nanofibras de forma a conferir-lhes propriedades adicionais, como atividade antibacteriana ou antioxidante. Alguns dos compostos normalmente utilizados para a obtenção de atividade antibacteriana são partículas metálicas, ou até mesmo compostos com essas propriedades, como os antibióticos por exemplo.

No entanto, com o intuito de diminuir o impacto destes compostos no organismo humano e de forma a utilizar compostos mais ecológicos, nos dias que correm tem sido muito estudada a utilização de compostos naturais para a obtenção dessas mesmas propriedades.

Neste sentido, alguns dos compostos naturais mais utilizados atualmente para a funcionalização de nanofibras consistem em óleos essenciais, ou até mesmo extratos obtidos diretamente de plantas.

3. Materiais e métodos

Neste segmento do trabalho, é possível encontrar o processo utilizado para a extração do alginato de sódio a partir de macroalgas, bem como todo o processo de produção e otimização das nanofibras produzidas pelo método de *electrospinning*

Tendo em conta as conclusões tiradas anteriormente, foram produzidas diferentes soluções de PEO e alginato de sódio que foram testadas numa ampla gama de parâmetros diferentes, de forma a otimizar a morfologia das fibras obtidas. Por fim, estas fibras foram funcionalizadas com resíduos resultantes do processo de extração.

Neste capítulo é também possível encontrar todos os materiais, desde equipamentos, a solventes e outros produtos, utilizados para a realização deste trabalho.

3.1. Materiais

Para a realização de todo o processo de extração, bem como o desenvolvimento de formulações para o processo de *electrospinning*, foram utilizados os materiais presentes na Tabela 8, bem como as especificações dos mesmos. Para o processo de extração foram utilizadas algas da espécie *Laminaria ochroleuca* e como reagentes foram utilizados etanol, carbonato de cálcio, ácido cítrico e acetona. Para o desenvolvimento das formulações poliméricas foi apenas utilizada água como solvente e, para além do alginato de sódio extraído, foi também utilizado PEO com peso molecular de 900 kDA.

Tabela 8 - Materiais utilizados
Acervo próprio

Materiais	Marca	Massa molar/ Concentração
Etanol (96 %(v/v))	JMGS	96 % (v/v)
Ácido Cítrico	*Chemlab*	192,124 g/mol
Carbonato de Sódio	*Univar Solutions*	105,988 g/mol
Acetona	JMGS	58,08 g/mol
Óxido polietileno (PEO)	*Sigma-Aldrich*	62,07 g/mol
Alginato de sódio	*Sigma-Aldrich*	216,121 g/mol

Na Figura 7 é possível ver o equipamento de *electrospinning* que foi utilizado para a realização deste trabalho. Similarmente a outros equipamentos de *electrospinning*, o equipamento utilizado (MECC NF-103) é composto por uma fonte de tensão, uma bomba e um coletor. Para além disto, o equipamento apresenta um painel de controlo que permite operar o equipamento, permitindo manipular diferentes fatores, como a distância entre a seringa e o coletor, a voltagem aplicada e a taxa de fluxo a usar.



Figura 7 - Equipamento de *electrospinning* MECC NF-103
Retirado de: *Tissue Engineering: A 3D Angioplasty* de: A. O. Lebedeva, P. P. Laktionov e V. V. Vlassov, 2014, *New Techonology in Medicine* 38. Direitos de autor: 2013, A. O. Lebedeva, P. P. Laktionov e V. V. Vlassov

Para a produção das membranas de nanofibras foram utilizadas uma seringa de 20 mL e uma agulha com um diâmetro de 0,61 mm. Para a realização deste trabalho foi utilizado apenas um tipo de coletor, o coletor estático; no entanto, o equipamento utilizado apresenta a capacidade de utilizar vários tipos de coletor, como coletores estáticos ou coletores rotativos, que permitem a produção de diferentes tipos de membranas.

3.2. Métodos

3.2.1. Processo de extração de alginato

A biomassa da macroalga *Laminaria ochroleuca* utilizada para a realização deste trabalho foi fornecida pelo Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), situado na região norte de Portugal. O processo de extração que foi desenvolvido e adaptado de um processo convencional para um processo mais ecológico, de forma a que o impacto ambiental do

processo de extração fosse o mais reduzido possível e que o rendimento da reação não fosse afetado.

Assim sendo, inicialmente as algas foram secas e trituradas de forma a que fosse possível obter um pó fino; de seguida, o pó obtido foi colocado em etanol (96 % (v/v)) durante 24 h com agitação, de forma a promover o processo de limpeza das mesmas. As algas foram depois filtradas e lavadas com água destilada. De maneira a que este processo seja o mais sustentável possível, os resíduos de etanol obtidos foram evaporados e foi possível obter um pó com uma mistura de extratos provenientes das algas.

De seguida, preparou-se uma solução aquosa de ácido cítrico (0,2 M), na qual as algas limpas foram colocadas em agitação durante 24 h. As algas foram depois filtradas e limpas novamente em água destilada e colocadas numa solução de carbonato de cálcio (2 % (w/v)) durante 3 h.

Após este processo o alginato de sódio extraído foi separado dos resíduos precipitados através da utilização de um processo de centrifugação a 4000 rpm durante 15 min. O processo seguinte consiste na precipitação do alginato de sódio e, para que tal seja possível, foi adicionado etanol (96 % (v/v)) ao sobrenadante resultante da centrifugação até que todo o alginato de sódio fosse precipitado. No final, o precipitado de alginato de sódio foi purificado com acetona e colocado a secar numa estufa a 50 °C durante a noite. O alginato de sódio, depois de seco, foi triturado, de forma a preparar soluções para que pudesse ser analisado. Todo o processo pode ser resumido no esquema representativo do processo de extração que se encontra de seguida na Figura 8.



Figura 8 - Esquema de extração do processo de extração
Acervo próprio

3.2.2. Produção de fibras por *electrospinning*

3.2.2.1. Processo de otimização dos parâmetros

De forma a ganhar algum conhecimento relativamente ao comportamento das misturas de alginato com PEO no equipamento de *electrospinning*, foram experimentadas diferentes soluções de alginato de sódio comercial com PEO usando diferentes parâmetros.

Inicialmente, foi produzida uma solução de 3 % de alginato de sódio comercial e 3 % de PEO, misturadas em rácios de 50/50 e 70/30 e foram testados os parâmetros otimizados nesse trabalho. Tendo isto em conta, para cada um dos parâmetros testados, foram realizadas deposições de 5 min em lâminas, para que fosse possível analisar a morfologia das fibras produzidas através de microscopia ótica. Assim sendo, todos os parâmetros testados para as soluções de alginato comercial podem consultar-se na Tabela 9, sendo que nas condições usadas nesta tabela o parâmetro f. corresponde à taxa de fluxo usada, v. corresponde à voltagem e d. corresponde às distâncias testadas.

Tabela 9 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato comercial
Acervo próprio

Alginato Comercial			
Concentração	**Condições**	**Feixe**	**Observações**
3 % SA 3 % PEO 30/70 (SA/PEO)	f.0.5/v.20/d.15	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.8/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.0.5/v.12/d.10	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.12/d.15	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.12/d.20	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.1.0/v.12/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.1.5/v.12/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
3 % SA 3 % PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.8/d.15	Formação de feixe muito leve com gotas ocasionais	
	f.0.5/v.12/d.10	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.12/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.0.5/v.12/d.20	Formação de feixe sem gotas	
	f.1.0/v.12/d.15	Formação de feixe sem gotas	

Tabela 10 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato comercial (continuação)

	f.1.5/v.12/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.0.5/v.20/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
3 % SA 3 % PEO 70/30 (SA/PEO)	f.0.5/v.8/d.15	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.12/d.10	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.12/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.0.5/v.12/d.20	Formação de feixe sem gotas	
	f.1.0/v.12/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.1.5/v.12/d.15	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.20/d.15	Formação de feixe sem gotas	
3 % SA 3 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.12/d.15	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.20/d.15	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.8/d.15	Não ocorre formação de feixe	
	f.0.5/v.12/d.20	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.20/d.20	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.20/d.25	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.8/d.20	Não ocorre formação de feixe	
	f.0.5/v.8/d.25	Não ocorre formação de feixe	
	f.0.5/v.12/d.25	Formação de feixe sem gotas	
3 % SA 3 %PEO 70/30 (SA/PEO)	f.0.5/v.12/d.15	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.8/d.15	Formação de feixe muito leve	
	f.0.5/v.20/d.15	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.12/d.20	Formação de feixe, mas com entupimento constante	
	f.0.5/v.20/d.20	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.8/d.20	Não ocorre formação de feixe	
	f.0.5/v.8/d.25	Não ocorre formação de feixe	
	f.0.5/v.12/d.25	Formação de feixe sem gotas	
	f.0.5/v.20/d.25	Formação de feixe sem gotas	

De seguida, depois de realizado o processo de extração, o processo de *electrospinning* foi repetido com o alginato extraído, utilizando os mesmos parâmetros otimizados e testados anteriormente. No entanto, possivelmente devido ao facto de o grau de pureza do alginato de sódio extraído ser inferior ao do alginato de sódio comercial, os parâmetros testados previamente não ofereceram as condições necessárias para a produção de fibras sem defeitos. Desta forma, foi realizado um processo de otimização, onde forma testadas diferentes concentrações e diferentes parâmetros, sendo que todos estes parâmetros estão presentes na Tabela 10, sendo que nas condições usadas nesta tabela o parâmetro f. corresponde à taxa de fluxo usada, v. corresponde à voltagem e d. corresponde às distâncias testadas.

Tabela 11 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato extraído
Acervo próprio

Alginato Extraído			
Concentração	**Condições**	**Feixe**	**Observações**
3 % SA 3 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.12/d.25	Não ocorre formação de feixe	
	f.0.5/v.16/d.25	Ocorrência de constante de gotas	
	f.0.5/v.20/d.25	Formação de feixe muito subtil	
	f.1.5/v.20/d.25	Formação de feixe	
	f.0.5/v.20/d.10	Ocorrência constante de gotas	
3 % SA 3 %PEO 70/30 (SA/PEO)	f.0.5/v.20/d.25	Formação de feixe	Verificou-se que com 70 % de alginato as soluções ficavam demasiado viscosas
	f.0.5/v.12/d.25	Não ocorre a formação de feixe	
	f.0.5/v.16/d.25	Formação de feixe	
	f.0.5/v.16/d.30	Formação de feixe	
	f.0.5/v.20/d.30	Formação de feixe	
	f.0.5/v.12/d.30	Não ocorre formação de feixe	
3 % SA 3 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.12/d.15	Formação constante de gotas	
	f.0.5/v.20/d.15	Feixe constantemente interrompido por gotas	
	f.1.5/v.20/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de feixe muito irregular	
	f.1.5/v.25/d.15	Formação de feixe muito irregular	

Tabela 12 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato extraído (continuação)

4 % SA 3 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.12/d.15	Não há formação de feixe	
	f.1.5/v.20/d.30	Não há formação de feixe	
	f.0.5/v.25/d.15	Não há formação de feixe	
	f.1.5/v.25/d.15	Não há formação de feixe	
3 % SA 5 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.12/d.15	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.0.5/v.20/d.15	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de feixe não contínuo	
	f.1.5/v.20/d.15	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.1.5/v.20/d.30	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.1.5/v.25/d.30	Formação de feixe com muitas gotas	
4 % SA 5 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.12/d.15	Formação de feixe muito subtil	
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.1.5/v.27/d.15	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.1.5/v.27/d.30	Formação de feixe com muitas gotas	
4 % SA 4 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Ocorrência de feixe com muitas interrupções	
	f.0.5/v.20/d.15	Ocorrência de feixe com muitas interrupções	
	f.0.5/v.25/d.15	Ocorrência de feixe com muitas interrupções	
	f.0.5/v.29/d.15	Ocorrência de feixe não contínuo	
	f.1.0/v.29/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.1.5/v.29/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
	f.0.5/v.29/d.10	Formação de feixe quase contínuo	
	f.0.5/v.15/d.10	Ocorrência de feixe não contínuo	
	f.0.5/v.20/d.10	Ocorrência de feixe não contínuo	
	f.0.5/v.25/d.10	Ocorrência de feixe não contínuo	
	f.1.0/v.25/d.10	Ocorrência de feixe não contínuo	
	f.1.5/v.25/d.10	Ocorrência de feixe não contínuo	

Tabela 13 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato extraído (continuação)

	f.2.0/v.25/d.10	Formação de feixe quase continuo	
	f.1.0/v.29/d.10	Ocorrência de feixe não contínuo	
	f.1.5/v.29/d.10	Ocorrência de feixe não contínuo	
	f.0.5/v.15/d.20	Não ocorre formação de feixe	
	f.0.5/v.20/d.20	Ocorrência de feixe não contínuo	
	f.0.5/v.25/d.20	Formação de feixe quase contínuo	
	f.0.5/v.29/d.20	Formação de feixe quase contínuo	
	f.1.0/v.29/d.20	Formação de feixe quase contínuo	
	f.1.5/v.29/d.20	Formação de feixe quase contínuo	
5 % SA 5 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.0.5/v.20/d.15	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.0.5/v.25/d.15	Feixe quase contínuo com gotas ocasionais	
	f.0.5/v.29/d.15	Feixe quase contínuo com gotas ocasionais	
	f.1.5/v.20/d.15	Formação constante de gotas	
	f.1.0/v.29/d.15	Formação de feixe com gotas ocasionais	
7 % SA 7 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Solução demasiado viscosa, não forma feixe	
	f.0.5/v.29/d.15	Solução demasiado viscosa, não forma feixe	
2 % SA 7 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Formação de feixe contínuo	
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de feixe não contínuo	
	f.0.5/v.29/d.15	Não ocorre formação de feixe, mas sim de gotas	
	f.2.5/v.29/d.15	Formação de feixe contínuo	
3 % SA 7 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Formação de feixe não contínuo	
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.0.5/v.29/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.2.5/v.29/d.15	Formação de feixe contínuo com gotas ocasionais	
4 % SA 7 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.0.5/v.29/d.15	Formação de feixe não continuo	

Tabela 14 - Parâmetros testados para otimização das fibras com alginato extraído (continuação)

	f.3.5/v.29/d.15	Formação de feixe contínuo	
5 % SA 7 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.0.5/v.29/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.3.5/v.29/d.15	Formação de feixe não continuo	
6 % SA 7 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Formação de gotas	Queda de voltagem
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de gotas	
2,5 % SA 2,5 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.0.5/v.25/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.0.5/v.29/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.2.0/v.29/d.15	Formação de feixe não continuo	
	f.3.0/v.29/d.15	Formação de feixe contínuo	
	f.3.0/v.29/d.20	Formação de feixe contínuo	
	f.0.5/v.15/d.20	Formação constante de gotas	
	f.1.5/v.15/d.20	Formação de feixe não contínuo	
	f.0.5/v.15/d.30	Formação de feixe contínuo	
	f.3.0/v.15/d.30	Formação de feixe contínuo	
	f.3.0/v.29/d.30	Formação de feixe contínuo	
6 % SA 6 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.0.5/v.15/d.15	Não ocorre a formação de feixe	Queda de voltagem
	f.0.5/v.25/d.15	Não ocorre a formação de feixe	
	f.0.5/v.29/d.15	Não ocorre formação de feixe	
2,5 % SA 2,5 %PEO 50/50 (SA/PEO)	f.3.0/v.20/d.12	Formação de feixe contínuo	Após analisar as lâminas retiradas no microscópio verificou-se que estes seriam os parâmetros mais indicados
	f.3.0/v.20/d.10	Formação de feixe contínuo	
	f.3.0/v.29/d.30	Formação de feixe com muitas gotas	
	f.3.0/v.29/d.15	Formação de feixe contínuo	
	f.3.0/v.29/d.12	Formação de feixe contínuo	
	f.3.0/v.29/d.12	Formação de feixe contínuo e foi testada a produção de membranas	

3.2.2.2. Preparação de soluções poliméricas

O alginato de sódio que foi extraído utilizando o processo descrito previamente, por não ter capacidade de formar fibras por si só utilizando a técnica de *electrospinning*, foi misturado numa solução aquosa com óxido polietileno (PEO) de elevado peso molecular. Inicialmente, foram preparadas duas soluções distintas dos dois polímeros, com concentrações de 2,5 % (w/v); depois da dissolução completa dos polímeros, as soluções foram misturadas num rácio de 50/50, de forma a obter uma concentração final de 5 %. Posto isto, as soluções foram deixadas em agitação sem temperatura durante a noite, de forma a garantir a homogeneidade completa das soluções.

3.2.2.3. Processo de *electrospinning*

A solução de PEO/SA preparada anteriormente foi fiada no equipamento NF-103, produzido pela empresa MECC Co., Ltd (Fukuoka, Japan). Posto isto, a solução foi transferida para uma seringa de 24 mL, que se conectou a uma agulha com 0,61 mm de diâmetro. Foi utilizado um coletor estático retangular para recolher as membranas de nanofibras produzidas; no entanto, para que tal fosse possível, foi necessário otimizar os parâmetros utilizados, sendo que as melhores fibras foram obtidas utilizando os parâmetros presentes na Tabela 11.

Tabela 15 - Parâmetros utilizados para a produção das nanofibras.
Acervo próprio

Parâmetros	Valores
Taxa de fluxo	3,0 ml/h
Voltagem	29 kV
Distância entre a agulha e o coletor	12 cm
Diâmetro da seringa	0,61 mm
Tempo de deposição	4 h
Humidade	60-65 %
Temperatura	20-23 °C

Após realização do processo de *electrospinning* utilizando as condições otimizadas referidas na Tabela 11, foram testados diferentes tempos de deposição para a produção de membranas (2, 4 e 6 h de deposição).

Tendo isto em conta, na Figura 6 estão apresentadas as membranas resultantes. Tanto a membrana de 4 h de deposição como a de 6 h de deposição foram destacáveis; a de 4 h foi consideravelmente mais fácil, resultando numa membrana com menos defeitos, como rasgos causados quando estas foram separadas da folha de alumínio. Desta forma, foi escolhida a membrana de 4 horas de deposição para a realização dos testes de caracterização.



Figura 9 - Resultados obtidos na deposição por *electrospinning* e respetivos tempos de deposição
Acervo próprio

3.2.3. Funcionalização das fibras produzidas

Depois de realizado o processo de extração do alginato, e de forma a que fosse possível tornar este processo o mais sustentável possível, foi abordada a ideia de reutilizar alguns dos resíduos do processo de extração. Estes resíduos produzidos na extração de alginato consistem em etanol com resíduos de algas e ácido cítrico. Os resíduos de etanol são provenientes do primeiro passo do processo de extração, que consiste na limpeza das algas em etanol, enquanto que os resíduos de ácido cítrico são provenientes do tratamento ácido que as algas também sofreram durante o processo de extração.

Assim sendo, os resíduos mais interessantes para a funcionalização das nanofibras seriam os resíduos de etanol com partículas de alga, semelhante à presente na Figura 10 (A).

De seguida, a solução etanólica obtida previamente foi evaporada e foi obtido um pó com os resíduos de alga extraídos que necessitam de ser secos numa estufa e triturados, como se pode ver na Figura 10 (B).



(A) (B)

Figura 10 - (A) Solução etanólica com resíduos de algas; (B) Resíduos obtidos em pó.
Acervo próprio

No entanto, surgiu um inconveniente, o pó resultante do processo de extração não é solúvel em água que é o solvente utilizado para a produção das soluções poliméricas pretendidas. Desta forma, de maneira a resolver este inconveniente testou-se dissolver o pó numa quantidade mínima de outro solvente, que seria então misturado com as soluções poliméricas otimizadas previamente.

Assim sendo, foram testados diferentes solventes, de forma a perceber qual seria o que dissolvia melhor os resíduos obtidos, tendo sido então estudada a dissolução em água, acetona, clorofórmio e DMF, como se pode verificar na Figura 11.

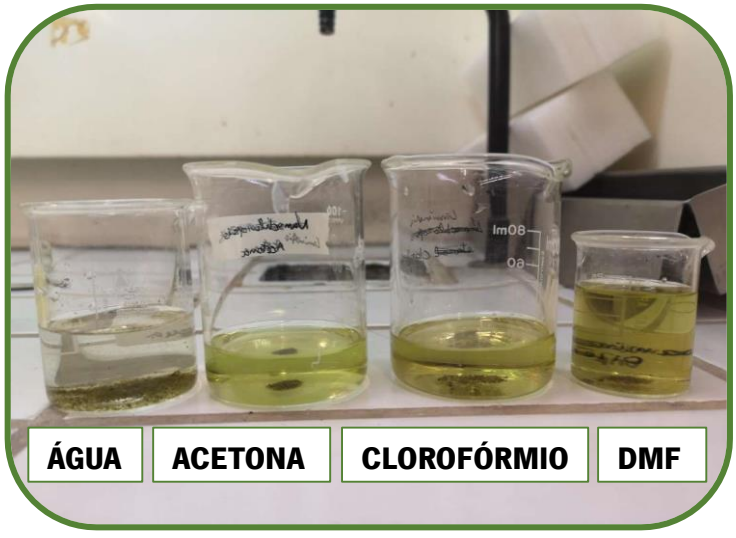


Figura 11 - 1° teste de dissolução dos resíduos
Acervo próprio

Foi então possível perceber que os melhores solventes seriam o clorofórmio e o DMF; no entanto, nenhum dos solventes dissolve completamente os extratos, deixando sempre algum precipitado.

De seguida, como o pó foi obtido através de uma solução etanólica, tentou-se dissolver os extratos em etanol 70 %, em 100 % etanol e em misturas de etanol/água com os rácios de 70/30,

60/40 e 50/50. No entanto, mais uma vez, não se verificou a dissolução dos compostos, como é possível verificar na Figura 12.

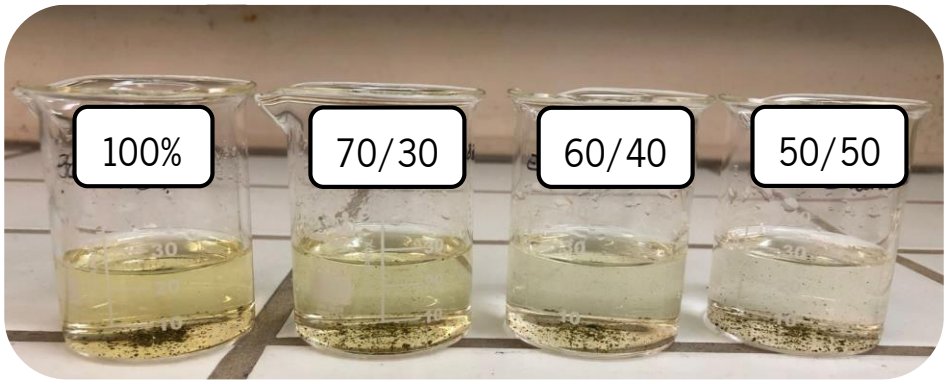


Figura 12 - Teste de dissolução dos resíduos em etanol
Acervo próprio

DMSO. Tanto em metanol como em DMSO se verificou a dissolução; no entanto, foi em DMSO que os extratos dissolveram melhor, apesar de ainda se verificar algum precipitado (Figuras 13 e 14).

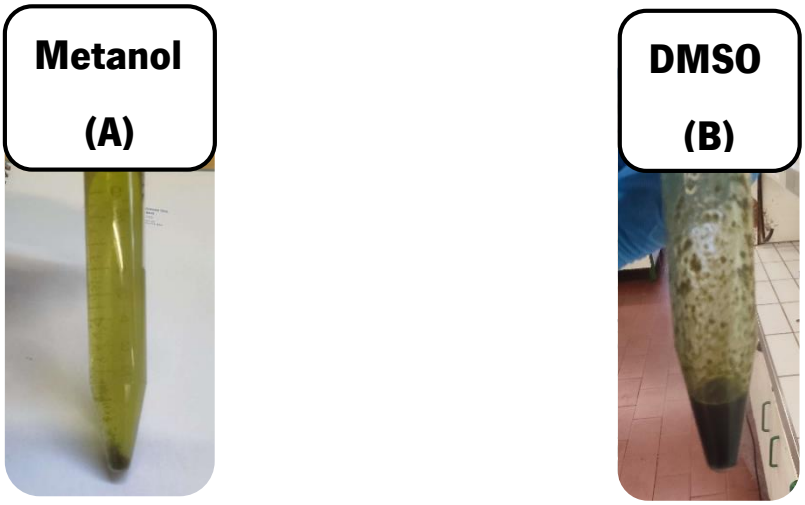


Figura 13 - Testes de solubilidade em Metanol (A) e DMSO (B).
Acervo próprio

Por fim, após os extratos obtidos serem dissolvidos em DMSO, estes puderam então ser incorporados nas soluções poliméricas de alginato de sódio com PEO, de forma a funcionalizar estas fibras com os resíduos das algas, conferindo algumas propriedades vantajosas às fibras.

3.3. Métodos de caracterização

3.3.1. Rendimento

O rendimento do processo de extração do alginato de sódio foi calculado utilizando a fórmula descrita abaixo (Equação 1).

$$Rendimento\ (\%) = \frac{Massa\ de\ alginato\ de\ sódio\ obtida}{Massa\ de\ algas\ secas\ utilizada} \times 100 \quad (1)$$

3.3.2. Viscosidade

A viscosidade das soluções é um dos fatores com um impacto elevado relativamente ao processo de *electrospinning*. Assim sendo, torna-se imperativo que a viscosidade das soluções seja descoberta, de forma a que o processo de fiação se torne o mais simples possível.

Neste contexto, a viscosidade da solução otimizada foi testada utilizando um viscosímetro rotativo Myr VR3000 (Figura 14). O princípio de funcionamento de um viscosímetro rotativo passa por submergir um *spindle* dentro de uma determinada solução que se pretende avaliar, sendo a viscosidade da solução medida através da medição da resistência que o *spindle* sofre ao girar a uma velocidade constante. Os viscosímetros rotativos têm a capacidade de utilizar vários *spindles*,



Figura 14 - Viscosímetro Myr VR3000 utilizado
Retirado de: Madar Yara, 2023, http://www.madaryara.com/en/device/viscometer-vr-3000

sendo que a escolha deste depende de várias variáveis, como a viscosidade da amostra a ser medida, a velocidade de rotação disponível e as características do líquido.

3.3.3. ATR-FTIR

O FTIR tem um funcionamento característico para ligações covalentes que permite analisar e modular o intervalo de frequências da radiação infravermelha; isto é, através de um detetor, a intensidade de luz transmitida ou refletida por uma amostra é medida em função do seu

comprimento de onda. Este fenómeno resulta num sinal que, após ser analisado através da transformada de Fourier, permite obter um espectro específico para cada material que se analisa, sendo os resultados apresentados com a transmitância em função do número de onda (cm^{-1}) que foi incidida.

Dentro da técnica de FTIR é possível utilizar diferentes abordagens de forma a obter informações específicas sobre a composição e estrutura de amostras, que podem ser transmissão, reflexão difusa, reflexão especular e reflexão total atenuada (ATR).

Utilizando a técnica de transmissão, a radiação infravermelha passa através da amostra e a intensidade da mesma é medida. Esta técnica é útil para determinar a quantidade de radiação absorvida pela amostra em diferentes comprimentos de onda, sendo que através destes resultados é possível identificar os grupos funcionais e os componentes presentes numa determinada amostra.

Relativamente à técnica de reflexão difusa, a luz infravermelha é direcionada sobre a superfície da amostra, sendo refletida e analisada de seguida. Esta técnica é geralmente utilizada quando a amostra não é transparente para a luz infravermelha, sendo normalmente utilizada em materiais sólidos.

A técnica de reflexão especular é semelhante à técnica de reflexão difusa; no entanto, foca-se na luz refletida de forma especular, sendo a luz refletida num ângulo específico em relação á superfície da amostra. Desta forma, esta técnica é geralmente utilizada para analisar superfícies lisas.

A técnica de reflexão total atenuada é utilizada quando a amostra é colocada em contacto direto com um cristal com elevado índice de refração e a luz infravermelha é transmitida para a amostra através desse cristal. Isto torna a área possível de analisar mais reduzida; no entanto, esta técnica é muito eficaz para análises tanto de amostras sólidas como líquidas e permite a análise das amostras sem a necessidade de preparar previamente as amostras (Ferreira, 2018).

A técnica escolhida para a realização dos ensaios de caracterização necessários foi a técnica de espetroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR), juntamente com a técnica de refletância total atenuada (ATR).

O ensaio do ATR-FTIR foi realizado num equipamento SHIMADZU IRAffinity-1S (Figura 15), ao qual foi acoplado um acessório de ATR. Neste equipamento foram analisados todos os materiais utilizados para a produção das membranas de nanofibras, bem como as próprias membranas.

Cada espetro foi obtido utilizando o modo de transmitância do cristal do acessório de ATR e foram obtidos através da acumulação de 40 leituras com uma resolução de 4 cm^{-1}, sendo que os testes foram realizados entre 400 e 4000 cm^{-1}.



Figura 15 - Equipamento SHIMADZU IRAffinity-1S
Acervo próprio

3.3.4. TGA

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica que tem como objetivo medir as mudanças de peso de um material à medida que a temperatura aumenta a uma taxa controlada sob uma atmosfera específica. A técnica de TGA é normalmente utilizada para analisar as propriedades térmicas e de decomposição de materiais sólidos, líquidos ou gasosos (Gabbot, 2008).

Esta técnica funciona tendo em conta alguns princípios básicos, nomeadamente a medição de massa, o aquecimento controlado e a atmosfera controlada.

A análise de TGA tem diversas aplicações, podendo ser utilizada para a determinação do peso molecular de uma amostra, avaliar a estabilidade térmica, analisar a quantidade de humidade, estudos de cinética de reações químicas ao analisar a taxa de decomposição ou reação em função da temperatura, determinação de composição de amostras, pois pode ajudar a determinar a composição de materiais complexos, identificando a quantidade de diferentes componentes numa amostra. Este tipo de análise pode até mesmo ajudar no processo de controlo de qualidade de materiais em algumas indústrias (Gabbot, 2008).

Esta análise é, então, uma ferramenta muito versátil em laboratórios, pois é capaz de fornecer informações valiosas sobre as propriedades térmicas e sobre a composição dos materiais.

Depois de realizado este teste de caracterização, obtém-se um gráfico que mostra a perda de peso de uma amostra em percentagem (%) em relação ao aumento da temperatura.

A análise termogravimétrica foi realizada num equipamento Hitachi STA7200 (Figura 16), numa atmosfera de nitrogénio, entre 30 e 600 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.



Figura 16 - Equipamento Hitachi STA 7200.
Acervo próprio

3.3.5. XRD

A tecnologia de difração de raios-X (XRD) é uma técnica que utiliza raios-X para analisar a estrutura de um determinado material. Esta técnica é utilizada para determinar a estrutura atómica ou molecular de sólidos cristalinos, ou então para determinar a composição de sólidos cristalinos desconhecidos. Alguns dos princípios principais da técnica de XRD são:

- Interferência construtiva: o fundamento básico desta técnica é a interferência construtiva de raios-X quando estes atingem os átomos numa rede cristalina de um determinado material. Os átomos num cristal geralmente estão distribuídos numa estrutura tridimensional, que faz com que os raios-X incididos sejam difratados em diversas direções.
- Lei de Bragg: A difração destes raios-X ocorre de acordo com a Lei de Bragg, que estabelece uma relação entre o ângulo de incidência dos raios-X com o comprimento de onda dos mesmos, bem como a distância entre os planos cristalinos e o ângulo de difração dos raios que foram previamente incididos. Esta lei permite obter informações sobre a disposição dos átomos na amostra.
- Padrão de Difração: quando os raios-X são difratados por um cristal, estes produzem um padrão de difração característico para cada amostra, que é composto por picos de intensidade que são medidos em função do ângulo de difração. A análise deste padrão de difração permite obter informações sobre a estrutura cristalina dos átomos numa determinada amostra.

Para a realização dos ensaios necessários para a caracterização dos polímeros pretendidos, foi utilizado um difractómetro Bruker D8 Discover, tal como é apresentado na figura 17.

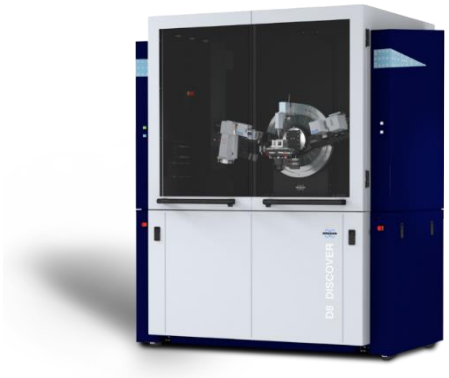


Figura 17 - Equipamento difractómetros Bruker D8 Discover.
Retirado de: Bruker, 2023, www.bruker.com/en/products-and-solutions/diffractometers-and-x-ray-microscopes/x-ray-diffractometers/d8-discover-family/d8-discover.html

Para o cálculo da cristalinidade de cada uma das amostras que forma testadas foi utilizada a equação 2.

$$Cl = \frac{Área\ de\ todos\ os\ picos\ cristalinos}{Áreas\ de\ todos\ os\ picos\ cristalinos\ e\ amorfos} \quad (2)$$

3.4. Caracterização de nanofibras produzidas por *electrospinning*

3.4.1. Microscopia ótica

A microscopia ótica é uma técnica que utiliza luz visível de forma a ampliar objetos ou estruturas que não são possíveis de observar a olho nu, onde é utilizado um sistema de lentes de forma a ampliar imagens de forma significativa de uma determinada amostra a analisar.

Os microscópios óticos funcionam tendo em conta alguns componentes básicos, nomeadamente uma fonte de luz, que é incidida numa amostra e coletada por um conjunto de lentes, formando uma imagem ampliada de uma determinada amostra. Os microscópios óticos geralmente apresentam um conjunto variado de lentes com capacidades de ampliação distintas, para que se torne possível aumentar ou diminuir a ampliação desejada conforme as diferentes amostras que se pretende analisar. Para além destas funcionalidades, os microscópios óticos, por norma, também permitem ajustar o foco de forma a obter as imagens mais nítidas possível.

Para a realização deste trabalho foi utilizado um microscópio LEICA DM750 (Figura 18) para analisar as nanofibras produzidas de uma forma preliminar. O microscópio utilizado consiste num conjunto de duas lentes e de 5 objetivas (5x, 10x, 20x, 50x e 100x).



Figura 18 - Microscópio Leica DM750 utilizado.
Acervo próprio

3.4.2. Microscopia eletrónica de varrimento (FESEM)

A tecnologia de microscopia eletrónica de varrimento (FESEM) tem a capacidade de produzir imagens tridimensionais com elevada resolução de uma determinada amostra, sendo geralmente utilizada para analisar a superfície de amostras, o tamanho de partículas à nanoescala, e pode ser até utilizada para avaliar microrganismos.

A tecnologia de FESEM utiliza um filamento especial como fonte de eletrões que é capaz de produzir eletrões com alta energia e eficiência devido ao fenómeno de emissão de campo que permite obter imagens de elevada resolução, mesmo com imagens de amostras na ordem dos nanómetros.

Nesta tecnologia o feixe de eletrões é varrido pela superfície da amostra, sendo que são formados eletrões secundários que são refletidos para um coletor, de forma a formar uma imagem, permitindo a criação de imagens topográficas e da composição da superfície de uma amostra.



Figura 19 - Equipamento NOVA 200 Nano SEM utilizado.
Retirado de: SEMAT, 2023, http://www.semat.lab.uminho.pt/Equipamento_1.htm

Para a realização deste trabalho esta tecnologia foi utilizada para a caracterização das nanofibras produzidas pela tecnologia de *electrospinning*, sendo que foi utilizado um equipamento NOVA 200 Nano SEM, produzido pela FEI Company (Hillsboro, OR, EUA), retratado na Figura 19.

As imagens foram obtidas através da utilização de uma voltagem de aceleração de 10 kV e foram processadas com o software *ImageJ*, de forma a analisar os diâmetros médios das fibras produzidas.

3.4.3. Ensaios antibacterianos

Após a obtenção de nanofibras de alginato de sódio e PEO adequadas, foram incorporados os extratos obtidos no processo de extração do alginato de sódio nas mesmas, de forma a conferir-lhes propriedades antibacterianas.

Neste sentido, de forma a perceber se os resíduos do processo de extração apresentam algum tipo de propriedades, foram realizados testes antibacterianos.

Inicialmente, os extratos foram dissolvidos em 5% DMSO, com uma concentração de 300 mg/mL, tendo sido realizado o teste de concentração mínima inibitória (MIC). Para este teste, inicialmente é definida uma concentração para a solução que se pretende testar e, de seguida, são realizadas diversas diluições seriadas para encontrar a concentração mínima que irá inibir o crescimento das bactérias pretendidas.

De seguida, de forma a compreender se as nanofibras funcionalizadas de facto apresentam alguma atividade antibacteriana ou não, foram também realizados ensaios antibacterianos para as membranas de nanofibras produzidas.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de absorção segundo a Norma Industrial Japonesa JIS Z 2801:2000, com algumas modificações. Os microrganismos testados foram o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538 (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 434 (Gram-negativa). Resumidamente, foram preparados inóculos de *E. coli* e *S. aureus* em 40,0 ± 0,1 mL de TSB (Tryptic Soy Broth) e incubados por um período de 18 a 24 horas a 37 ± 1 °C sob agitação (120 rpm).

Posteriormente, as concentrações microbianas foram ajustadas para 3 x 10^8 células/mL através de leituras de absorbância e com base numa curva de calibração correspondente. Uma fração de cada suspensão (400 μL) foi adicionada a 20 mL de TSB e incubada por três horas a 37 ± 1 °C. A concentração microbiana foi novamente determinada e obteve-se uma concentração celular de 3 x 10^5 células/mL através de uma diluição de 20 vezes do respetivo meio (em água destilada). Adicionou-se 50 μL deste inóculo a cada amostra colocada em placa de Petri. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 ± 1 °C, sem agitação. Em seguida, 5 mL de solução salina fisiológica foram adicionados às amostras, que foram então agitadas em vórtex. A quantificação de células vivas foi determinada pelo método das unidades formadoras de colónias (CFU).

4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão descritos e analisados todos os resultados dos ensaios de caracterização mencionados anteriormente, que foram realizados nas diferentes etapas da realização deste trabalho.

A primeira fase da componente prática deste trabalho consistiu no processo de extração do alginato de sódio e a caracterização do mesmo utilizando diferentes tecnologias.

De seguida, foram realizados diversos ensaios de caracterização, tanto para as soluções poliméricas utilizadas no equipamento de *electrospinning*, como para as nanofibras produzidas.

Por fim, as nanofibras produzidas foram funcionalizadas utilizando os resíduos obtidos durante processo de extração e caracterizadas.

4.1. Extração e caracterização do alginato de sódio obtido a partir de macroalgas

O alginato de sódio extraído através do processo descrito anteriormente foi caracterizado por diversos processos e tecnologias, começando-se pelo cálculo do rendimento deste processo. De seguida foram utilizadas as tecnologias de ATR-FTIR, TGA e XRD, de forma a caracterizar o polímero obtido, comparando-o com alginato comercial.

4.1.1. Rendimento

De forma a determinar o rendimento do processo utilizado para a extração do alginato de sódio da macroalga *L. ochroleuca*, a equação 1 foi utilizada. Utilizando uma massa de 20 g de macroalga moída, foi possível obter um rendimento de 25,15 %.

Desta forma, foi possível perceber que o processo utilizado, apesar de ser consideravelmente mais ecológico do que os processos convencionais e até mais ecológico do que alguns processos "verdes" descritos, apresenta um rendimento bastante próximo dos outros processos.

O valor obtido para o rendimento está em concordância com aqueles encontrados na literatura para *L. ochroleuca* (28,96 ± 0,20 %) e com outras espécies do gênero *Laminaria,* nomeadamente *L. hyperborean* (14 - 21 %) utilizando métodos convencionais (Black, 1950; Flórez-Fernández et al., 2019; Kaidi et al., 2022).

4.1.2. ATR- FTIR

De forma a avaliar a composição química do alginato de sódio extraído, a técnica de ATR-FTIR foi utilizada. Na Figura 20 é possível observar os espectros obtidos realizado nas amostras de alginato de sódio comercial, bem como no alginato que foi extraído utilizando o processo descrito anteriormente.

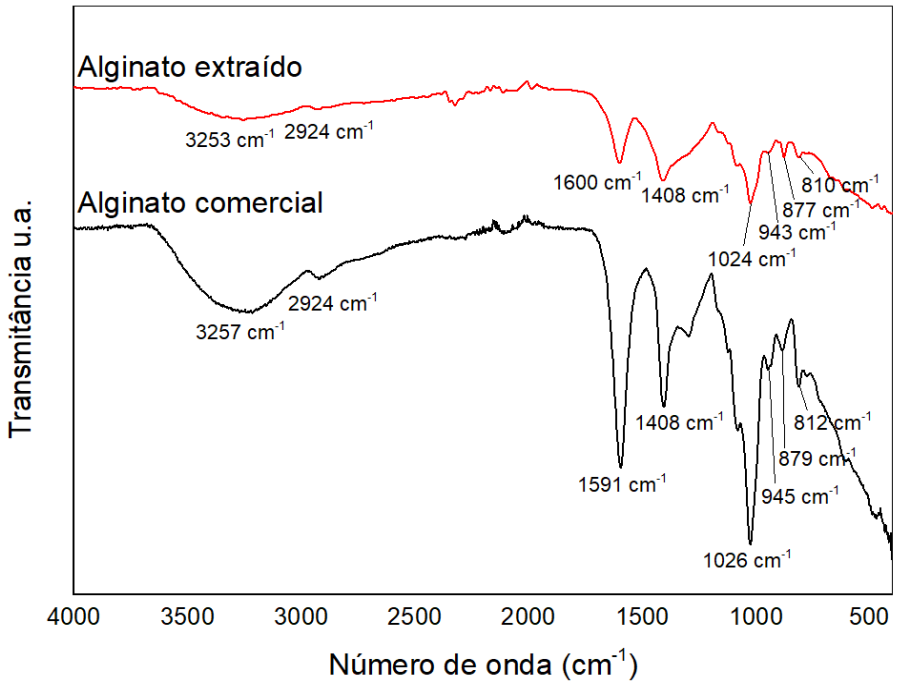


Figura 20 - Espetro de ATR-FTIR de alginato de sódio comercial e extraído.
Acervo próprio

Através da análise cuidadosa dos espectros representados, é possível perceber que em ambos os compostos analisados se encontram os picos característicos do alginato de sódio, nomeadamente nos números de onda de aproximadamente: 3250 cm^{-1}, 2920 cm^{-1}, 1600 cm^{-1}, 1400 cm^{-1}, e 1025 cm^{-1}. Estes picos correspondem, respetivamente, ao alongamento das ligações O-H, alongamento das vibrações C-H, e alongamento assimétrico do grupo carboxilato O-C-O (Fertah et al., 2017; Flórez-Fernández et al., 2019).

Para além destes, nos números de onda de 879 e 812 cm^{-1} estão presentes picos correspondentes aos ácidos manurónicos e gulurónicos, respetivamente. Estes picos são atribuídos à deformação C-H do ácido β-manurônico, vibrações de alongamento de ligações C-O e vibrações da deformação C-C-O dos ácidos manurónicos e gulurónicos (Khajouei et al., 2018).

Para além destes, ambos os alginatos apresentam um pico no número de onda de 945 cm^{-1}, que é indicativo de ácido urónico característico pela presença da vibração de alongamento C-O.

Os picos encontrados no espectro apresentado na Figura 20 são geralmente associados a alginatos de sódio extraídos de algas castanhas, que apresentam um rácio de ácidos manurónicos (M) e ácidos gulurónicos (G) superior a 1, contendo quantidades superiores de ácido manurónico (Belattmania et al., 2020; Flórez-Fernández et al., 2019; Kelly & Brown, 2000; Rashedy et al., 2021). A ausência de picos nos números de onda entre 1230 e 1280 cm^{-1}, está relacionado com os grupos éster sulfatos (S = O) presentes em polissacarídeos sulfatados, como fucoidanos ou laminarina, o que poderá ser um indicador de que nenhum destes polissacarídeos foi extraído durante o processo de extração utilizado para o alginato de sódio (Kaidi et al., 2022; Rashedy et al., 2021).

Desta forma, foi possível perceber que o processo de extração utilizado para extrair alginato de sódio da alga *L. ochroleuca* realizado com sucesso utilizando o processo descrito anteriormente.

4.1.3. TGA

De seguida, foi realizado o teste da avaliação termogravimétrica de forma a avaliar a forma de como o alginato de sódio extraído se comporta com o aumento da temperatura, sendo que este teste foi também repetido para o alginato de sódio comercial, para que fosse possível obter um termo de comparação.

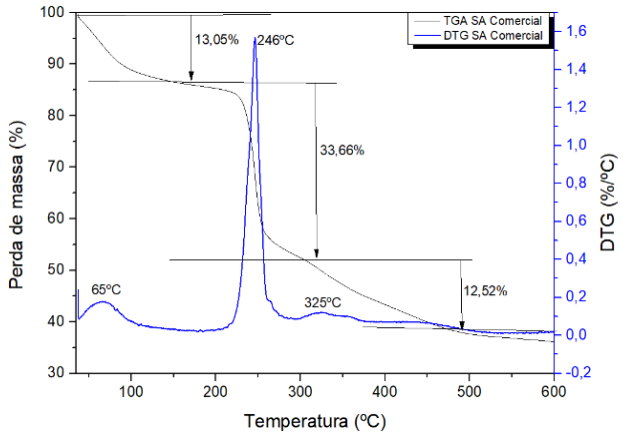


Figura 21 - Gráfico de TGA para a amostra de alginato de sódio comercial. Acervo próprio

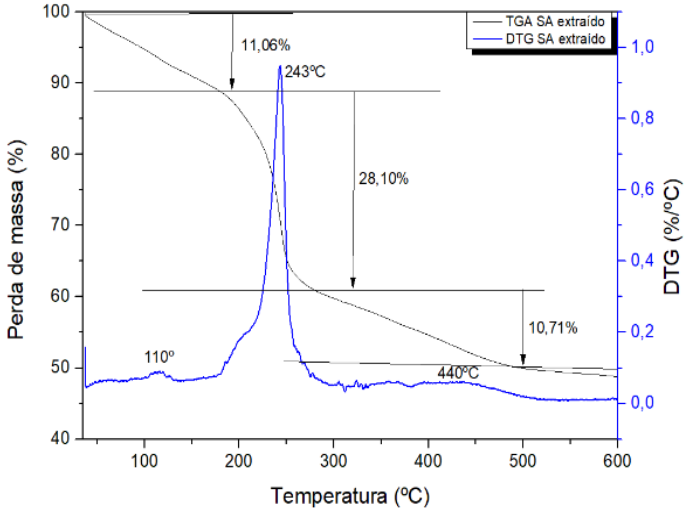


Figura 22 - Gráfico de TGA para a amostra de alginato de sódio extraído. Acervo próprio

De acordo com as figuras 21 e 22, é possível verificar que ambos os alginatos (comercial e extraído) apresentam três principais etapas de degradação. Na primeira fase, que ocorreu entre os 30 e os 180 °C, foi registada uma perda de peso de 13% para o alginato comercial e de aproximadamente 6,5% para o alginato extraído. A perda de massa registada nesta fase acontece devido à perda de compostos voláteis nas amostras, como por exemplo vapor de água (Flores-Hernández et al., 2021). A diferença dos valores entre as duas amostras pode ocorrer devido ao facto de, no caso do alginato extraído, depois de ter sido precipitado, ter sido seco numa estufa a 50 °C, tendo grande parte dos compostos voláteis sido já evaporados. Em contraste, o alginato de sódio comercial poderá conter um nível de humidade superior.

De seguida, a segunda fase de perda de peso foi registada entre os 180 e os 300 °C, com uma degradação máxima a aproximadamente 240 °C, tanto para o alginato comercial como para o extraído. Nesta etapa, ocorreu uma perda de massa de aproximadamente 30% para ambos os compostos, que ocorre devido à despolimerização do alginato – a destruição das ligações glicosídicas presentes no mesmo (Flores-Hernández et al., 2021).

A terceira etapa ocorreu entre os 300 e os 500 °C para ambos os polímeros testados, verificando-se uma perda de massa de aproximadamente 10%, que pode ser associada à decomposição do alginato de sódio isolado, onde os fragmentos e os monómeros de alginato são convertidos em Na_2CO_3 (Flores-Hernández et al., 2021).

Estudos anteriores relativamente à degradação de alginatos devido ao efeito da temperatura também descrevem o processo de degradação do alginato de sódio em três etapas

distintas. A primeira etapa é relatada como ocorrer devido à perda de componentes voláteis, como a perda de humidade na desidratação – para o alginato de sódio esta etapa foi reportada a começar a aproximadamente 210 °C. De seguida, ocorre a despolimerização do alginato, que está associada à destruição de ligações glicosídicas, ocorre geralmente entre 240 e 260 °C. Para o alginato de sódio, a perda de peso máxima ocorre a 245 °C. Após este pico, continua a ocorrer o processo de desvolatilização durante um intervalo de temperatura bastante elevado, até atingir a temperatura de 520 °C. Por fim, ocorre uma segunda fase de degradação na qual os fragmentos dos monómeros de alginato são transformados em Na_2CO_3 (Ross et al., 2011; Soares et al., 2004).

Para a *L. digitata,* após existir uma perda de peso de aproximadamente 5% atribuída para a perda de humidade, segue-se o que talvez seja o passo mais crucial na degradação térmica da biomassa – entre 125-325 °C, o grau de volatilização atinge um máximo e há uma perda relatada entre 40 e 50% relativamente ao peso de massa inicial. Este máximo é indicado por um pico intenso na curva de DTG por volta dos 250 °C para o alginato de sódio. A fase seguinte é considerada um período com perda de peso mais lenta (Rowbotham et al., 2013).

Tendo isto em conta foi concluído que, mais uma vez, ambos os alginatos testados apresentam comportamentos semelhantes relativamente à perda de peso com o aumento temperatura, o que mais uma vez poderá contribuir para corroborar a extração bem-sucedida do alginato de sódio.

4.1.4. XRD

Com o intuito de avaliar a cristalinidade do alginato de sódio extraído foi utilizada a técnica de XRD. Na figura 23 encontram-se representados os padrões de XRD para os alginatos de sódio extraído e comercial.

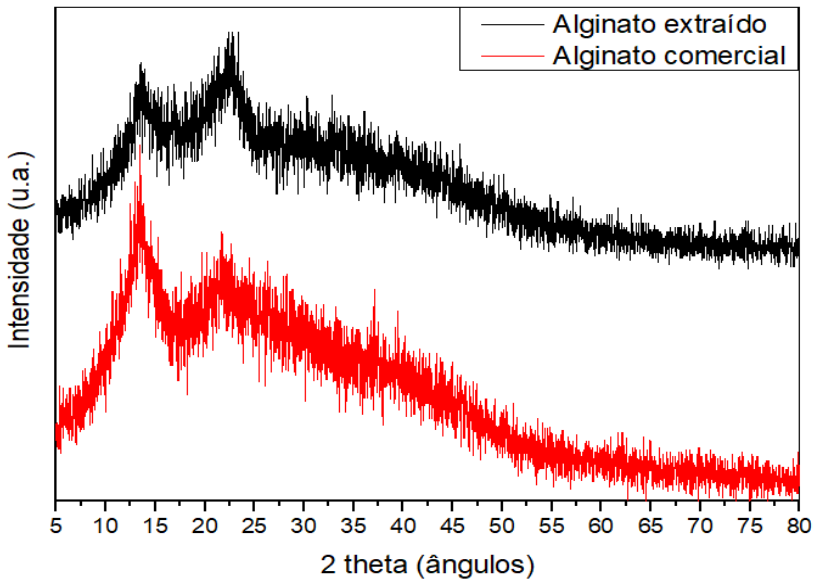


Figura 23 - Gráfico de XRD para ambos os alginatos.
Acervo próprio

Através da análise do padrão de difração do pó de alginato comercial, foram identificados dois picos distintos em 2θ = 13,5 ° e em 2θ = 22,6 °, o que indica que o alginato comercial apresenta uma estrutura sem-cristalina. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por (Kane et al., 2016).

O mesmo padrão de XRD foi encontrado para o pó de alginato extraído, onde foi determinada a cristalinidade do alginato de sódio utilizando a Equação 2, obtendo-se um valor de cristalinidade de 33,98%. Como tal, foi então comprovado que o alginato também apresenta uma estrutura semi-cristalina (Kane et al., 2016).

Deste modo, tendo em conta a análise de XRD, foi concluído que o alginato extraído de *L. ochroleuca* apresenta uma estrutura cristalina semelhante ao alginato comercial que foi encontrado na literatura de 35,62%, isto pode ser devido ao facto de o alginato comercial apresentar um grau de pureza superior (Kane et al., 2016).

Tendo em conta todos os resultados obtidos, foi possível concluir que o alginato de sódio foi extraído com sucesso utilizando o processo descrito anteriormente, no entanto este deverá apresentar um grau de pureza inferior ao alginato de sódio comercial.

4.2. Caracterização das fibras e soluções poliméricas

Após a extração e devida caracterização do alginato de sódio, este polímero foi utilizado para a preparação de formulações poliméricas para serem utilizadas no *electrospinning*, de forma a produzir nanofibras.

A viscosidade das soluções poliméricas foi determinada, e as nanofibras obtidas foram caracterizadas utilizando microscopia ótica, FESEM, ATR-FTIR e TGA.

4.2.1. Viscosidade

A viscosidade das soluções poliméricas é um dos fatores mais importantes para o processo de *electrospinning*, pois este parâmetro influencia diretamente a morfologia das fibras obtidas. Para a realização deste ensaio foi utilizado o Spindle R3 com uma velocidade de 4 rpms e foi obtida uma viscosidade de 24920 mPAS.

4.2.2. Microscopia ótica

Através da tecnologia de microscopia ótica foi realizado um estudo preliminar das nanofibras obtidas. Durante o processo de otimização dos parâmetros a utilizar no *electrospinning*, foram tiradas amostras dos diferentes parâmetros a cada 5 min de deposição, de forma a que fosse possível obter uma ideia preliminar da influência dos parâmetros a testar nas nanofibras produzidas (Figuras 24 a 27).

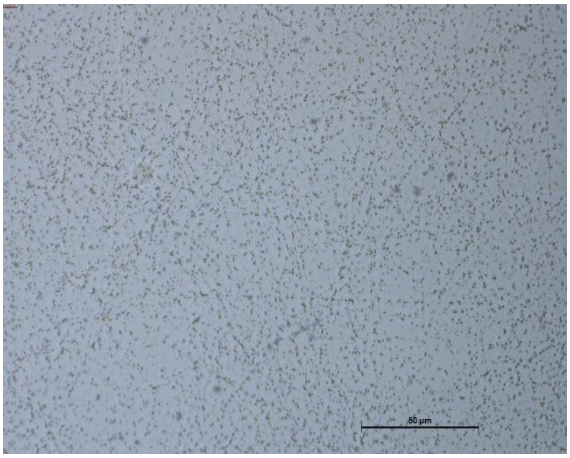


Figura 27 - Fibras obtidas com 3% PEO e 3% alginato de sódio

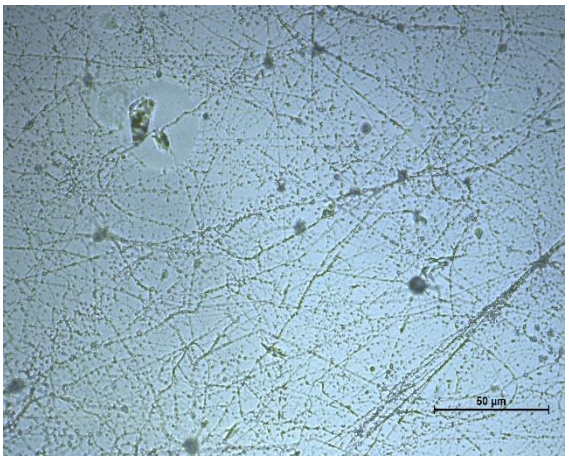


Figura 27 - Fibras obtidas com 3% PEO e 3% alginato de sódio

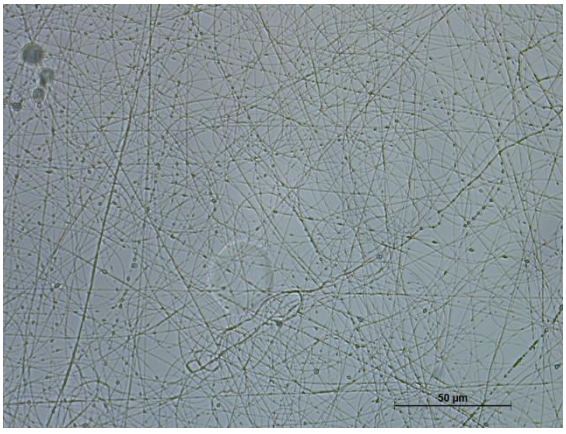


Figura 27 - Fibras obtidas com 2,5% PEO e 2,5% alginato de sódio

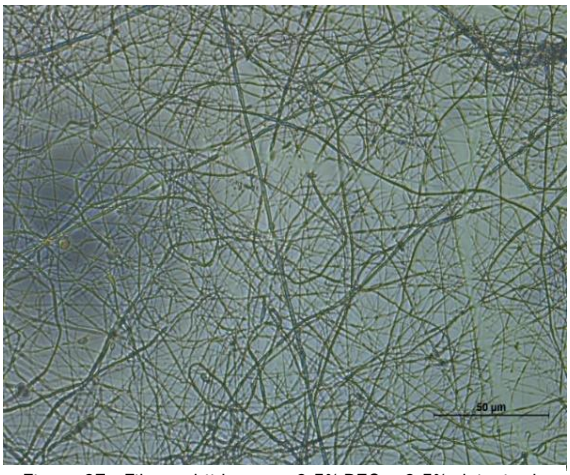


Figura 27 - Fibras obtidas com 2,5% PEO e 2,5% alginato de sódio em condições otimizadas.

Como se pode verificar através da análise das imagens seguintes e, depois de testar diversos parâmetros para otimizar as nanofibras produzidas, é possível verificar uma melhoria contínua nas fibras obtidas durante este processo. Inicialmente, foi necessário otimizar as soluções poliméricas a utilizar, sendo que os resultados que se mostraram mais positivos foram com uma solução com 2,5% de alginato de sódio e 2,5% de PEO.

Posto isto, foi determinado que as melhores condições para a produção das nanofibras com esta solução seriam uma voltagem de 29 kV, uma taxa de fluxo de 5 mL/h, com uma distância entre a seringa e o coletor de 12 cm. Isto foi comprovado pela análise das imagens de microscopia ótica que foram obtidas, tal como se pode verificar nas Figuras 24, 25, 26 e 27.

4.2.3. FESEM

Após todo o processo de otimização e de produção das membranas de nanofibras através da técnica de *electrospinning*, a morfologia das membranas foi analisada. Neste sentido, de forma a analisar a uniformidade das mesmas, as fibras que foram obtidas após o processo de *electrospinning* foram analisadas utilizando a tecnologia de FESEM, onde foi possível obter as seguintes imagens presentes na figura 28.

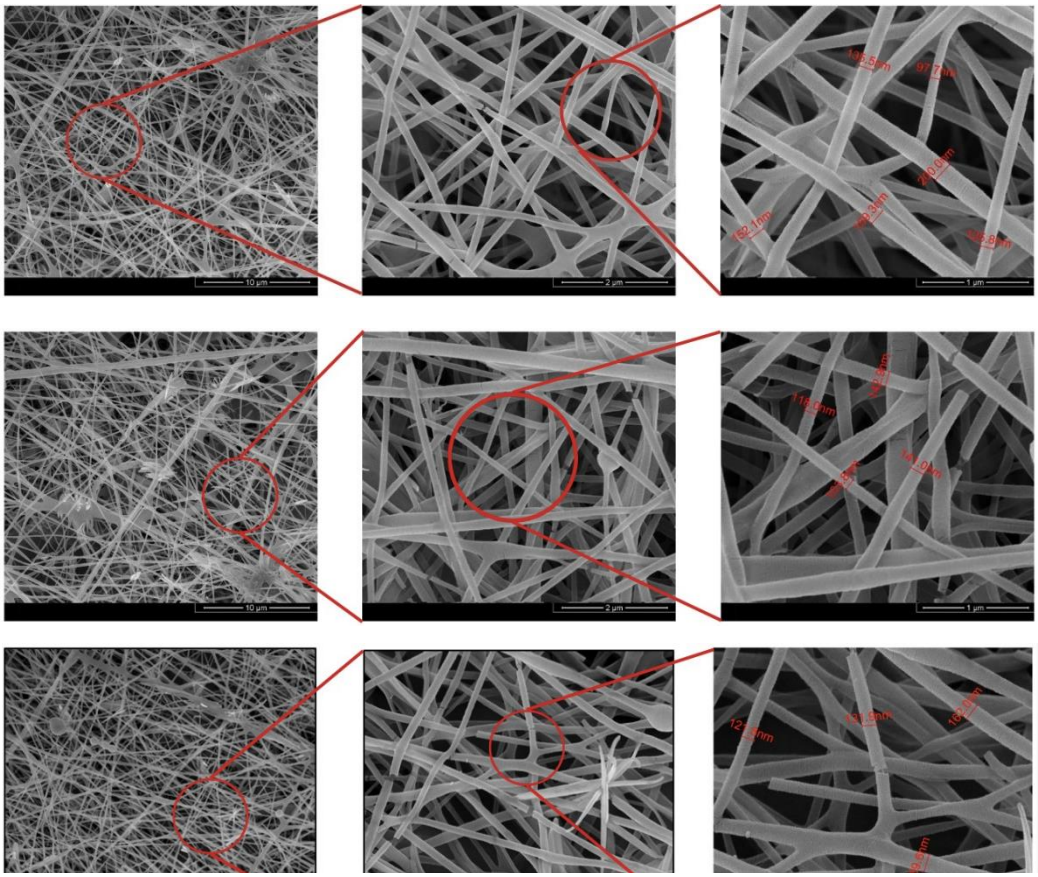


Figura 28 - Imagens de SEM das membranas de alginato de sódio/PEO produzidas.
Acervo próprio

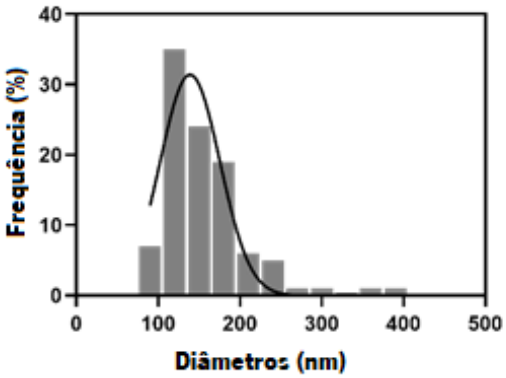


Figura 29 - Histograma de distribuição dos diâmetros das nanofibras produzidas.
Acervo próprio

Através da análise cuidadosa das imagens obtidas, foi possível perceber que as fibras têm uma morfologia uniforme apresentando muito poucos defeitos.

De seguida, foram medidos os diâmetros das fibras em 100 pontos aleatórios utilizando o software *imageJ* e foi calculada a média desses valores, tendo sido obtido um diâmetro médio de 156 nm (Figura 29).

4.2.4. ATR-FTIR

Depois de realizado todo o processo de otimização e de caracterização das nanofibras, foi produzida uma membrana com as condições mais adequadas.

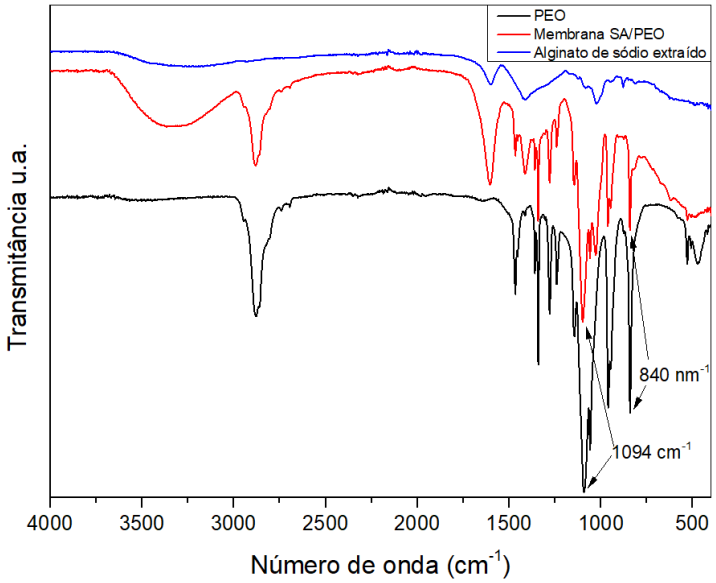


Figura 30 - Espetro de ATR-FTIR das membranas produzidas.
Acervo próprio

Através da análise do espetro de ATR-FTIR apresentado na Figura 30, e comparando com os resultados obtidos na análise do espetro do alginato de sódio extraído previamente analisados, é percetível que a membrana de nanofibras produzida apresenta os picos característicos do alginato de sódio que foram referidos previamente.

No entanto, como as nanofibras produzidas têm na sua composição uma mistura de alginato de sódio com PEO, foi também analisado o espetro deste polímero, de forma a verificar se a sua presença nas nanofibras é identificável.

Segundo (C. Hu et al., 2015), as bandas características do PEO podem ser observadas nos números de onda de 842 cm^{-1} e 1099 cm^{-1}, que correspondem à flexão das ligações C-O-C e alongamento assimétrico das mesmas. Como é possível verificar no espetro de ATR-FTIR, ambos os picos se encontram presentes, tanto no espetro de PEO, como no das nanofibras produzidas, revelando que as membranas produzidas são de facto compostas por alginato de sódio e PEO.

4.2.5. TGA

As membranas de nanofibras produzidas por *electrospinning* também foram caracterizadas por TGA (Figura 31).

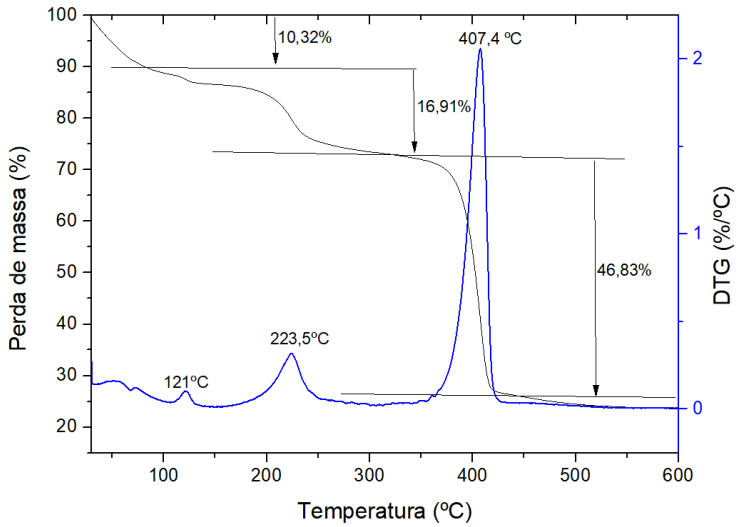


Figura 31 - Gráfico de TGA da membrana produzida.
Acervo próprio

Após a análise da Figura 31 foi possível verificar que ocorreram 3 etapas principais de perda de peso. A primeira etapa ocorre entre 0 e 125 °C, havendo um pico de perda de massa a uma temperatura de 120 °C. Durante esta etapa ocorreu uma perda de massa de cerca de 10%,

que pode ser justificado através da perda de peso devida à evaporação de compostos voláteis presentes nas membranas avaliadas (Flores-Hernández et al., 2021).

A segunda etapa de degradação ocorre aproximadamente entre os 125 e os 350 °C, verificando-se um pico de perda de massa à temperatura de 223 °C. Durante esta etapa ocorreu uma perda de massa de aproximadamente 16,9%, que pode ser atribuída à despolimerização do alginato de sódio presente nas nanofibras por rutura das ligações glicosídicas presentes no polímero (Flores-Hernández et al., 2021).

A etapa final de perda de peso foi verificada entre as temperaturas de aproximadamente 350 e 425 °C, sendo que durante esta etapa foi verificado um pico de perda de massa na temperatura de 407 °C. Segundo (Fatahi et al., 2021), este pico corresponde à temperatura de decomposição do PEO, que encontrou este pico de decomposição do PEO a cerca de 414 °C, um valor próximo do encontrado aqui.

Deste modo, é possível verificar que as membranas de nanofibras produzidas apresentam comportamentos semelhantes tanto ao alginato de sódio como também apresentam características do PEO, ou seja, é possível concluir que estas membranas apresentam de facto, uma mistura destes dois polímeros.

4.3. Incorporação do extrato etanólico nas nanofibras por *electrospinning*

Tendo em conta a aplicação pretendida para as membranas de nanofibras produzidas (materiais para tratamento de feridas) é de extrema importância que estas apresentem propriedades antibacterianas, pois evitariam a proliferação bacteriana, possibilitando uma mais rápida regeneração da pele.

Neste sentido, de forma a avaliar a potencial atividade antibacteriana do extrato, foi realizada a determinação da concentração mínima inibitória (MIC), utilizando a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*). Contudo, não foi possível determinar a MIC com a máxima concentração de extrato avaliada, tendo-se verificado que com as concentrações de 300, 150, 75 e 37,5 mg/mL as soluções apresentavam uma inibição entre 30 a 40% para a bactéria *E. coli*.. Assim sendo, com uma concentração de extrato de 37,5 mg/mL foi possível inibir 30-40% das bactérias, sendo que com o aumento da concentração de extrato, a percentagem de inibição manteve-se. Desta forma, apenas foi possível determinar a $MIC_{30\text{-}40}$.

Considerando estes resultados, na solução polimérica otimizada para a produção das nanofibras foram incorporados os extratos obtidos numa concentração de 40 mg/mL.

De seguida, de forma a avaliar a atividade antibacteriana das membranas de nanofibras produzidas, foram também realizados ensaios antibacterianos para estas membranas.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 12.

Tabela 16 - Resultados para os ensaios antibacterianos

Amostras	*E. coli*	*S. aureus*
Membrana alginato de sódio/PEO	Bactericida	Bactericida
Membrana alginato de sódio/PEO + extrato	Bactericida	Bactericida

Após a realização deste ensaio foi então verificado que, para ambas as bactérias, tanto as amostras de nanofibras de alginato/PEO como as dee alginato/PEO/extrato apresentaram atividade total, verificando-se uma redução de 9 log, ou seja, as membranas são completamente bactericidas, o que significa que estas amostras foram capazes de induzir a morte das bactérias, ao invés de apenas inibir o seu crescimento.

Estes resultados são um pouco contraditórios pois, tal como foi referido anteriormente, não era esperado que o alginato de sódio e o PEO apresentassem atividade antibacteriana, uma vez que nenhum destes polímeros apresentam propriedades antibacterianas intrínsecas.

No entanto, como não foi utilizado alginato de sódio comercial, mas sim alginato de sódio extraído utilizando um processo mais ecológico, seria de esperar que os alginatos de sódio apresentem algumas diferenças. Por exemplo, visualmente o alginato de sódio extraído apresenta uma cor acastanhada, ao contrário do alginato de sódio comercial, que apresenta uma cor amarelada ou até mesmo branca originaria dos vários processos de purificação. Para além disso, através da análise de ATR-FTIR foi possível perceber que os diferentes alginatos apresentam espectros diferentes e, consequentemente características diferentes.

Isto significa que o alginato de sódio comercial, após ser extraído, sofre um processo de purificação e branqueamento, com o objetivo de remover outros compostos (Sondermeijer et al., 2016), algo que não foi realizado para o alginato extraído no presente trabalho.

Segundo (Sondermeijer et al., 2016), o alginato de sódio não purificado possui também diversos componentes, desde proteínas, lipopolissacarídeos, DNA e RNA, sendo que cada um destes compostos pode induzir a produção de anticorpos, podendo até interferir com a difusão de nutrientes e oxigénio.

Desta forma, estes resultados podem ter ocorrido devido ao facto de, durante o processo de extração do alginato, juntamente com este polímero, terem sido possivelmente extraídos outros

compostos das algas com atividade antibacteriana que não tenham sido retirados do alginato de sódio através de um processo de purificação.

Segundo (Liang et al., 2022), é amplamente aceite que as bactérias podem colonizar inerentemente superfícies biológicas e não biológicas, podendo colonizar feridas abertas. No início do processo de formação de feridas, as bactérias Gram-positivas são dominantes, especialmente *S. aureus.* De seguida, as espécies Gram-negativas como a *E. coli*, são detetadas, pois estas tentam invadir camadas mais profundas da pele, causando danos significativos aos tecidos. Desta forma, é ideal que os curativos utilizados para auxiliar ao processo de cicatrização tenham capacidade de eliminar estes tipos de bactérias.

5. Conclusão

Depois de realizada toda a componente prática, foi possível perceber que ambas as etapas abordadas, tanto o processo de extração de alginato de sódio, como o processo de produção de nanofibras, apresentaram resultados bastante positivos.

Relativamente ao processo de extração, este foi bem-sucedido, obtendo-se um rendimento de aproximadamente 25 %, um valor próximo do obtido em estudos anteriores através de processos mais poluentes, conferindo um carácter positivo e de maior sustentabilidade a este processo.

A caracterização do alginato de sódio extraído através de diversos métodos, nomeadamente pela tecnologia de ATR-FTIR, confirmou a extração deste alginato, devido à presença dos picos característicos no espectro de transmitância obtido. Através da tecnologia de TGA, foi também comprovado que o alginato de sódio obtido é semelhante ao alginato comercial testado, devido ao facto de as temperaturas de degradação serem semelhantes.

Em relação ao processo de produção de nanofibras, através da análise das imagens de microscopia ótica foi percetível que se produziram nanofibras de alginato de sódio com PEO com sucesso, com um rácio de 50/50, sendo que as fibras obtidas apresentam um diâmetro médio de 156 nm e apresentam muito poucos defeitos.

De seguida, foi realizada a deposição destas nanofibras durante 4 h, tendo sido obtida uma membrana possível de destacar, que foi então testada utilizando novamente as técnicas de ATR-FTIR e de TGA. Foi possível perceber que as membranas produzidas apresentam os picos de transmitância característicos de ambos os polímeros utilizados (SA e PEO), comprovando por ATR-FTIR a formação de nanofibras com a mistura dos polímeros. Foi também realizada análise por TGA, que confirmou a presença dos dois polímeros, devido a verificar-se que as membranas tiveram picos de degradação nas temperaturas de degradação características de ambos os polímeros, comprovando mais uma vez a formação de nanofibras com mistura de polímeros.

Após a produção das membranas de nanofibras, estas foram então funcionalizadas com resíduos do processo de extração do alginato de sódio de modo que fosse possível conferir propriedades antibacterianas às mesmas. Neste contexto, foram então realizados os ensaios de MIC para os extratos obtidos, onde foi possível obter então a concentração mínima deste extrato necessária para a inibição do crescimento tanto de bactérias gram-positivas, como gram-negativas. Foi então concluído que as membranas apresentam propriedades antimicrobianas, tanto para as membranas funcionalizadas, como para as membranas sem extratos, algo que não vai de encontro

com o esperado pois, como já foi referido anteriormente, nem o alginato de sódio nem o PEO apresentam propriedades antibacterianas. No entanto, sugere-se que estes resultados possam ter sido obtidos por o alginato de sódio extraído não ter sido submetido a um processo de purificação, podendo ainda estar presentes outros compostos com atividade antibacteriana que possam ter sido extraídos paralelamente ao alginato.

6. Referências bibliográficas

Abdelrahman, T., & Newton, H. (2011). Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)*, *29*(10), 491–495. https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2011.06.007

Abrigo, M., McArthur, S. L., & Kingshott, P. (2014). Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. *Macromolecular Bioscience*, *14*(6), 772–792. https://doi.org/10.1002/MABI.201300561

Aderibigbe, B. A., & Buyana, B. (2018). *pharmaceutics Alginate in Wound Dressings*. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020042

Ahmed Al-moalemi, H., Izwan Abd Razak, S., & Pauliena Mohd Bohari, S. (2022). ELECTROSPUN SODIUM ALGINATE/POLY(ETHYLENE OXIDE) NANOFIBERS FOR WOUND HEALING APPLICATIONS: CHALLENGES AND FUTURE DIRECTIONS. *CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY Cellulose Chem. Technol*, *56*(4), 251–270.

Belattmania, Z., Kaidi, S., Atouani, S. El, Katif, C., Bentiss, F., Jama, C., Reani, A., Sabour, B., & Vasconcelos, V. (2020). Isolation and FTIR-ATR and 1H NMR Characterization of Alginates from the Main Alginophyte Species of the Atlantic Coast of Morocco. *Molecules 2020, Vol. 25, Page 4335*, *25*(18), 4335. https://doi.org/10.3390/MOLECULES25184335

Black, W. A. P. (1950). The seasonal variation in weight and chemical composition of the common British Laminariaceae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *29*(1), 45–72. https://doi.org/10.1017/S0025315400056186

Bojorges, H., Fabra, M. J., López-Rubio, A., & Martínez-Abad, A. (2022). Alginate industrial waste streams as a promising source of value-added compounds valorization. *Science of The Total Environment*, *838*, 156394. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156394

Bojorges, H., López-Rubio, A., Martínez-Abad, A., & Fabra, M. J. (2023). Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, *140*, 104142. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2023.104142

Bojorges, H., Martínez-Abad, A., Martínez-Sanz, M., Rodrigo, M. D., Vilaplana, F., López-Rubio, A., & Fabra, M. J. (2023). Structural and functional properties of alginate obtained by means of high hydrostatic pressure-assisted extraction. *Carbohydrate Polymers*, *299*, 120175. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2022.120175

Bonefeld, B. (2019). *TaraTekstile A feasibility study on Blue Fashion using cultivated seaweed for textile production Final report*.

Borazjani, N. J., Tabarsa, M., You, S. G., & Rezaei, M. (2017). Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from Sargassum angustifolium. *International Journal of Biological Macromolecules*, *101*, 703–711. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.03.128

Caballero, E., Flores, A., & Olivares, A. (2021). Sustainable exploitation of macroalgae species from Chilean coast: Characterization and food applications. *Algal Research*, *57*, 102349. https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102349

Cao, Y., Shao, P., Chen, Y., Zhou, X., Yang, L., Shi, H., Yu, K., Luo, X., & Luo, X. (2021). A critical review of the recovery of rare earth elements from wastewater by algae for resources recycling technologies. Em *Resources, Conservation and Recycling* (Vol. 169). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105519

Chae, T., Yang, H., Leung, V., Ko, F., & Troczynski, T. (2013a). *Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration*. https://doi.org/10.1007/s10856-013-4957-7

Chapagain, A. K., Hoekstra, A. Y., Savenije, H. H. G., & Gautam, R. (2006). *The water footprint of cotton consumption: An assessment of the impact of worldwide consumption of cotton products on the water resources in the cotton producing countries*. https://doi.org/10.1016/j.eco

Chapman, R. L. (2013). Algae: The world's most important «plants»-an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, *18*(1), 5–12. https://doi.org/10.1007/s11027-010-9255-9

Chapman, V. J., & Chapman, D. J. (1973). *The Algae*. Palgrave Macmillan.

Charoensiddhi, S., Conlon, M. A., Franco, C. M. M., & Zhang, W. (2017). The development of seaweed-derived bioactive compounds for use as prebiotics and nutraceuticals using enzyme technologies. *Trends in Food Science & Technology*, *70*, 20–33. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.10.002

Costa, S. M., Fangueiro, R., & Ferreira, D. P. (2022). Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy: The Potentiality and Versatility of Electrospun Nanofibers. Em *Macromolecular Bioscience* (Vol. 22, Número 5). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/mabi.202100512

Dantas, M. D. M., Cavalcante, D. R. R., Araújo, F. E. N., Barretto, S. R., Aciole, G. T. S., Pinheiro, A. L. B., Ribeiro, M. A. G., Lima-Verde, I. B., Melo, C. M., Cardoso, J. C., & Albuquerque, R.

L. C. (2011). Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *105*(1), 51–59. https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2011.06.009

De Silva, R. T., Dissanayake, R. K., Mantilaka, M. M. M. G. P. G., Wijesinghe, W. P. S. L., Kaleel, S. S., Premachandra, T. N., Weerasinghe, L., Amaratunga, G. A. J., & De Silva, K. M. N. (2018). Drug-Loaded Halloysite Nanotube-Reinforced Electrospun Alginate-Based Nanofibrous Scaffolds with Sustained Antimicrobial Protection. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *10*(40), 33913–33922. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.8B11013/ASSET/IMAGES/LARGE/AM-2018-11013C_0003.JPEG

Deghrigue Abid, M., Lajili, S., Hadj Ammar, H., Cherif, D., Eltaief, N., Majdoub, H., & Bouraoui, A. (2019). Chemical and Biological Properties of Sodium Alginates Isolated from Tow Brown Algae *Dictyopteris Membranaceae* and *Padina Pavonica*. *Trends Journal of Sciences Research*, *4*(2), 62–67. https://doi.org/10.31586/pharmacology.0402.03

Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). *ELSEVIER Journal of Electrostatics 35 (1995) 151o160 Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers*.

Draget, K. I. (2009). Alginates. Em *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition* (pp. 807–828). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1533/9781845695873.807

Fatahi, Y., Sanjabi, M., Rakhshani, A., Motasadizadeh, H., Darbasizadeh, B., Bahadorikhalili, S., & Farhadnejad, H. (2021). Levofloxacin-halloysite nanohybrid-loaded fibers based on poly (ethylene oxide) and sodium alginate: Fabrication, characterization, and antibacterial property. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *64*. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102598

Fawzy, M. A., Gomaa, M., Hifney, A. F., & Abdel-Gawad, K. M. (2017). Optimization of alginate alkaline extraction technology from Sargassum latifolium and its potential antioxidant and emulsifying properties. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 1903–1912. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.077

Feng, X., Meng, X., Zhao, J., Miao, M., Shi, L., Zhang, S., & Fang, J. (2015). Extraction and preparation of cellulose nanocrystals from dealginate kelp residue: structures and morphological characterization. *Cellulose*, *22*(3), 1763–1772. https://doi.org/10.1007/s10570-015-0617-z

Ferreira, L. (2018). *Desenvolvimento de Métodos Instrumentais de Análise aplicado à Indústria das Resinas Naturais*.

Fertah, M., Belfkira, A., Dahmane, E. montassir, Taourirte, M., & Brouillette, F. (2017). Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan Laminaria digitata brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, S3707–S3714. https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2014.05.003

Flores-Hernández, C. G., De, M., Cornejo-Villegas, A., Moreno-Martell, A., & Real, A. Del. (2021). *Synthesis of a Biodegradable Polymer of Poly (Sodium Alginate/Ethyl Acrylate)*. https://doi.org/10.3390/polym13040504

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

Gabbot, P. (2008). *Principles and Applications of Thermal Analysis*.

Gacesa, P. (1987). *Alginates*.

Gao, F., Liu, X., Chen, W., Guo, W., Chen, L., & Li, D. (2018). Hydroxyl radical pretreatment for low-viscosity sodium alginate production from brown seaweed. *Algal Research*, *34*, 191–197. https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.07.017

Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., O'Doherty, J. V., & Sweeney, T. (2017). Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food Research International*, *99*, 1011–1020. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.11.016

Gardner, R. L. (2004). Application of Alginate Gels to the Study of Mammalian Development. Em *From: Methods in Molecular Biology* (Vol. 254).

Glibert, P. M., Seitzinger, S., Heil, C. A., Burkholder, J. M., Parrow, M. W., Codispoti, L. A., & Kelly, V. (2005). *Eutrophication Th e Role of in the Global Proliferation of Harmful Algal Blooms*. www.ut.ee/~olli/eutr/

Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, *88*(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.11.012

Gomez, L. P., Alvarez, C., Zhao, M., Tiwari, U., Curtin, J., Garcia-Vaquero, M., & Tiwari, B. K. (2020). Innovative processing strategies and technologies to obtain hydrocolloids from

macroalgae for food applications. *Carbohydrate Polymers*, *248*, 116784. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116784

Gullón, B., Gagaoua, M., Barba, F. J., Gullón, P., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2020). Seaweeds as promising resource of bioactive compounds: Overview of novel extraction strategies and design of tailored meat products. *Trends in Food Science & Technology*, *100*, 1–18. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.03.039

Hajiali, H., Summa, M., Russo, D., Armirotti, A., Brunetti, V., Bertorelli, R., Athanassiou, A., & Mele, E. (2016). Alginate–lavender nanofibers with antibacterial and anti-inflammatory activity to effectively promote burn healing. *Journal of Materials Chemistry B*, *4*(9), 1686–1695. https://doi.org/10.1039/C5TB02174J

Hallegraeff, G., Anderson, D. M., & Cembella, A. (1995). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing.

Hashimoto, T., Suzuki, Y., Tanihara, M., Kakimaru, Y., & Suzuki, K. (2004). Development of alginate wound dressings linked with hybrid peptides derived from laminin and elastin. *Biomaterials*, *25*(7–8), 1407–1414. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.07.004

Hernández-Carmona, G., Freile-Pelegrín, Y., & Hernández-Garibay, E. (2013). Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, 475–516. https://doi.org/10.1533/9780857098689.3.475

Hifney, A. F., Fawzy, M. A., Abdel-Gawad, K. M., & Gomaa, M. (2018). Upgrading the antioxidant properties of fucoidan and alginate from Cystoseira trinodis by fungal fermentation or enzymatic pretreatment of the seaweed biomass. *Food Chemistry*, *269*, 387–395. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.07.026

Hsu, S. H., Shu, W. W., Hsieh, S. C., Tsai, C. L., Chen, D. C., & Tan, T. S. (2004). Evaluation of chitosan-alginate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. *Volume 28, Issue 8, Pages 693 - 703*, *28*(8), 693–703. https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2004.00046.x

Hu, C., Gong, R. H., & Zhou, F. L. (2015). Electrospun sodium alginate/polyethylene oxide fibers and nanocoated yarns. *International Journal of Polymer Science*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/126041

Hu, W. P., Zhang, B., Zhang, J., Luo, W. L., Guo, Y., Chen, S. J., Yun, M. J., Ramakrishna, S., & Long, Y. Z. (2017). Ag/alginate nanofiber membrane for flexible electronic skin. *Nanotechnology*, *28*(44), 445502. https://doi.org/10.1088/1361-6528/AA8746

Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., & Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: Macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. Em *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications* (Vol. 9781461412472, pp. 55–98). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2_2

Islam, M. S., & Karim, M. R. (2010). Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *366*(1–3), 135–140. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2010.05.038

Izawa, H., Kawakami, K., Sumita, M., Tateyama, Y., Hill, J. P., & Ariga, K. (2013). β-Cyclodextrin-crosslinked alginate gel for patient-controlled drug delivery systems: Regulation of host-guest interactions with mechanical stimuli. *Journal of Materials Chemistry B*, *1*(16), 2155–2161. https://doi.org/10.1039/c3tb00503h

Janarthanan, M., & Senthil Kumar, M. (2019). Extraction of alginate from brown seaweeds and evolution of bioactive alginate film coated textile fabrics for wound healing application. *Journal of Industrial Textiles*, *49*(3), 328–351. https://doi.org/10.1177/1528083718783331/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1528083718783331-FIG12.JPEG

Jeong, S. I., Krebs, M. D., Bonino, C. A., Samorezov, J. E., Khan, S. A., & Alsberg, E. (2010). Electrospun Chitosan–Alginate Nanofibers with In Situ Polyelectrolyte Complexation for Use as Tissue Engineering Scaffolds. *https://home.liebertpub.com/tea*, *17*(1–2), 59–70. https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2010.0086

Kaidi, S., Bentiss, F., Jama, C., Khaya, K., Belattmania, Z., Reani, A., & Sabour, B. (2022). Isolation and Structural Characterization of Alginates from the Kelp Species Laminaria ochroleuca and Saccorhiza polyschides from the Atlantic Coast of Morocco. *Colloids and Interfaces*, *6*(4). https://doi.org/10.3390/colloids6040051

Kane, S. N., Mishra, A., & Dutta, A. K. (2016). *Preface: International Conference on Recent Trends in Physics (ICRTP 2016)*. https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001

Kant, R. (2012). Textile dyeing industry an environmental hazard. *Natural Science*, *04*(01), 22–26. https://doi.org/10.4236/ns.2012.41004

Kataria, K., Gupta, A., Rath, G., Mathur, R. B., & Dhakate, S. R. (2014a). In vivo wound healing performance of drug loaded electrospun composite nanofibers transdermal patch. *International Journal of Pharmaceutics*, *469*(1), 102–110. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2014.04.047

Kelly, B. J., & Brown, M. T. (2000). Variations in the alginate content and composition of Durvillaea antarctica and D. willana from southern New Zealand. *Journal of Applied Phycology*, *12*, 317–324.

Khajouei, R. A., Keramat, J., Hamdami, N., Ursu, A. V., Delattre, C., Laroche, C., Gardarin, C., Lecerf, D., Desbrières, J., Djelveh, G., & Michaud, P. (2018). Extraction and characterization of an alginate from the Iranian brown seaweed Nizimuddinia zanardini. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 1073–1081. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.06.154

Khil, M.-S., Cha, D.-I., Kim, H.-Y., Kim, I.-S., & Bhattarai, N. (2003). *Electrospun Nanofibrous Polyurethane Membrane as Wound Dressing*. https://doi.org/10.1002/jbm.b.10058

Kim, J. O., Park, J. K., Kim, J. H., Jin, S. G., Yong, C. S., Li, D. X., Choi, J. Y., Woo, J. S., Yoo, B. K., Lyoo, W. S., Kim, J. A., & Choi, H. G. (2008). Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *International Journal of Pharmaceutics*, *359*(1–2), 79–86. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2008.03.021

Kong, Q., Yu, Z., Ji, Q., & Xia, Y. (2008). Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide), gelatin and nanometer silver colloid. *Volume 610-613, Pages 1188 - 1191*, *610–613*, 2008. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.610-613.1188

Kulkarni, A., Bambole, V. A., & Mahanwar, P. A. (2010). Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, *49*(5), 427–441. https://doi.org/10.1080/03602550903414019

Kyzioł, A., Michna, J., Moreno, I., Gamez, E., & Irusta, S. (2017). Preparation and characterization of electrospun alginate nanofibers loaded with ciprofloxacin hydrochloride. *European Polymer Journal*, *96*, 350–360. https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2017.09.020

Łabowska, M. B., Michalak, I., & Detyna, J. (2019). Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field - A review. *Open Chemistry*, *17*(1), 738–762. https://doi.org/10.1515/chem-2019-0077

Laroche, C., Michaud, P., & Laroche, C. (966). *A novel alginate from the brown seaweed Sargassum turbinaroides (Sargassae). A novel alginate from the brown seaweed Sargassum turbinaroides (sargassae)*. https://www.researchgate.net/publication/258770591

Lee, H., Xu, G., Kharaghani, D., Nishino, M., Song, K. H., Lee, J. S., & Kim, I. S. (2017). Electrospun tri-layered zein/PVP-GO/zein nanofiber mats for providing biphasic drug release profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, *531*(1), 101–107. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.08.081

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *37*(1), 106–126. https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.06.003

Li, W. J., Laurencin, C. T., Caterson, E. J., Tuan, R. S., & Ko, F. K. (2002). Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Volume 60, Issue 4, Pages 613 - 621*, *60*(4), 613–621. https://doi.org/10.1002/jbm.10167

Li, Z., & Wang, C. (2013). Introduction of Electrospinning. Em *SpringerBriefs in Materials* (pp. 1–13). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36427-3_1

Li, Z., & Zhang, M. (2005). *Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering*. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30449

Liakos, I., Rizzello, L., Scurr, D. J., Pompa, P. P., Bayer, I. S., & Athanassiou, A. (2014). All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International Journal of Pharmaceutics*, *463*(2), 137–145. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.10.046

Liang, Y., Liang, Y., Zhang, H., & Guo, B. (2022). Antibacterial biomaterials for skin wound dressing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *17*, 353–384. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.01.001

Machmudah, S., Wahyudiono, Kanda, H., & Goto, M. (2020). Emerging seaweed extraction techniques: Supercritical fluid extraction. *Sustainable Seaweed Technologies: Cultivation, Biorefinery, and Applications*, 257–286. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00010-X

Mallikarjuna, B., Madhusudana Rao, K., Siraj, S., Chandra Babu, A., Chowdoji Rao, K., & Subha, M. C. S. (2013). Sodium alginate/poly (ethylene oxide) blend hydrogel membranes for controlled release of valganciclovir hydrochloride. *Designed Monomers and Polymers*, *16*(2), 151–159. https://doi.org/10.1080/15685551.2012.705503

Marampouti, C., Buma, A. G. J., & Karin De Boer, & M. (2020). *ENVIRONMENTAL TOXICITY ASSESSMENT: STATE OF THE ART AND FUTURE DIRECTIONS IN A WORLD OF ARISING THREATS Mediterranean alien harmful algal blooms: origins and impacts*. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10383-1/Published

Maréchal, J. P., Hellio, C., & Hu, C. (2017). A simple, fast, and reliable method to predict Sargassum washing ashore in the Lesser Antilles. *Remote Sensing Applications: Society and Environment*, *5*, 54–63. https://doi.org/10.1016/j.rsase.2017.01.001

Mena-García, A., Ruiz-Matute, A. I., Soria, A. C., & Sanz, M. L. (2019). Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *119*, 115612. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.07.023

Michalak, I., & Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*, *14*(6), 581–591. https://doi.org/10.1002/ELSC.201400139

Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. Em *Engineering in Life Sciences* (Vol. 15, Número 2, pp. 160–176). Wiley-VCH Verlag. https://doi.org/10.1002/elsc.201400191

Mohammed, A., Bissoon, R., Bajnath, E., Mohammed, K., Lee, T., Bissram, M., John, N., Jalsa, N. K., Lee, K. Y., & Ward, K. (2018). Multistage extraction and purification of waste Sargassum natans to produce sodium alginate: An optimization approach. *Carbohydrate Polymers*, *198*, 109–118. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.06.067

Mohammed, A., Rivers, A., Stuckey, D. C., & Ward, K. (2020). Alginate extraction from Sargassum seaweed in the Caribbean region: Optimization using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, *245*. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116419

Mokhena, T. C., & Luyt, A. S. (2017). Electrospun alginate nanofibres impregnated with silver nanoparticles: Preparation, morphology and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, *165*, 304–312. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.068

Mokhena, T. C., Mochane, M. J., Mtibe, A., John, M. J., Sadiku, E. R., & Sefadi, J. S. (2020). Electrospun alginate nanofibers toward various applications: A review. *Materials*, *13*(4). https://doi.org/10.3390/ma13040934

Moon, S. C., Ryu, B. Y., Choi, J. K., Jo, B. W., & Farris, R. J. (2009). The morphology and mechanical properties of sodium alginate based electrospun poly(ethylene oxide) nanofibers. *Polymer Engineering & Science*, *49*(1), 52–59. https://doi.org/10.1002/PEN.21216

Moura, L. I. F., Dias, A. M. A., Carvalho, E., & De Sousa, H. C. (2013). Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. *Acta Biomaterialia*, *9*(7), 7093–7114. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.03.033

Ni, P., Bi, H., Zhao, G., Han, Y., Wickramaratne, M. N., Dai, H., & Wang, X. (2019). Electrospun preparation and biological properties in vitro of polyvinyl alcohol/sodium alginate/nano-hydroxyapatite composite fiber membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *173*, 171–177. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.09.074

Nie, H., He, A., Wu, W., Zheng, J., Xu, S., Li, J., & Han, C. C. (2009). Effect of poly(ethylene oxide) with different molecular weights on the electrospinnability of sodium alginate. *Polymer*, *50*(20), 4926–4934. https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2009.07.043

Peng, C. W., Lin, H. Y., Wang, H. W., & Wu, W. W. (2012). The influence of operating parameters on the drug release and anti-bacterial performances of alginate wound dressings prepared by three-dimensional plotting. *Materials Science and Engineering: C*, *32*(8), 2491–2500. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2012.07.031

Peteiro, C. (2018). Alginate production from marine macroalgae, with emphasis on kelp farming. *Springer Series in Biomaterials Science and Engineering*, *11*, 27–66. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6910-9_2/COVER

Queffelec, J., Flórez-Fernández, N., Domínguez, H., & Torres, M. D. (2021). Microwave hydrothermal processing of Undaria pinnatifida for bioactive peptides. *Bioresource Technology*, *342*, 125882. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125882

Rafienia, M., Saberi, A., & Poorazizi, E. (2017). A novel fabrication of PVA/Alginate-Bioglass electrospun for biomedical engineering application. *Nanomed. J.*, *4*(3), 152–163. https://doi.org/10.22038/nmj.2017.03.003

Rashedy, S. H., Abd El Hafez, M. S. M., Dar, M. A., Cotas, J., & Pereira, L. (2021). Evaluation and Characterization of Alginate Extracted from Brown Seaweed Collected in the Red Sea. *Applied Sciences 2021, Vol. 11, Page 6290*, *11*(14), 6290. https://doi.org/10.3390/APP11146290

Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T., Ajalloueian, F., & Meyer, A. S. (2017). Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: Sargassum spp. and Padina spp. *Food Hydrocolloids*, *71*, 236–244. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.05.016

Ross, A. B., Hall, C., Anastasakis, K., Westwood, A., Jones, J. M., & Crewe, R. J. (2011). Influence of cation on the pyrolysis and oxidation of alginates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *91*, 344–351. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2011.03.012

Rostami, Z., Tabarsa, M., You, S. G., & Rezaei, M. (2017). Relationship between molecular weights and biological properties of alginates extracted under different methods from Colpomenia peregrina. *Process Biochemistry*, *58*, 289–297. https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2017.04.037

Rowbotham, J. S., Dyer, P. W., Greenwell, H. C., Selby, D., & Theodorou, M. K. (2013). Copper(II)-mediated thermolysis of alginates: A model kinetic study on the influence of metal ions in the thermochemical processing of macroalgae. *Interface Focus*, *3*(1). https://doi.org/10.1098/rsfs.2012.0046

Ruiz-Aceituno, L., García-Sarrió, M. J., Alonso-Rodriguez, B., Ramos, L., & Sanz, M. L. (2016). Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (Cynara scolymus L.) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. *Food Chemistry*, *196*, 1156–1162. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.046

Sachan, N. K., Pushkar, S., Jha, A., & Bhattcharya, A. (2009). Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. *Journal of Pharmacy Research*, *2*(8), 1191–1199. www.phresearchjournal.info

Saji, S., Hebden, A., Goswami, P., & Du, C. (2022). A Brief Review on the Development of Alginate Extraction Process and Its Sustainability. Em *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Número 9). MDPI. https://doi.org/10.3390/su14095181

Saquing, C. D., Tang, C., Monian, B., Bonino, C. A., Manasco, J. L., Alsberg, E., & Khan, S. A. (2013). Alginate-polyethylene oxide blend nanofibers and the role of the carrier polymer in electrospinning. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *52*(26), 8692–8704. https://doi.org/10.1021/ie302385b

Sari-Chmayssem, N., Taha, S., Mawlawi, H., Guégan, J. P., Jeftić, J., & Benvegnu, T. (2016). Extracted and depolymerized alginates from brown algae Sargassum vulgare of Lebanese origin: chemical, rheological, and antioxidant properties. *Journal of Applied Phycology*, *28*(3), 1915–1929. https://doi.org/10.1007/S10811-015-0676-4/TABLES/5

Sellimi, S., Younes, I., Ayed, H. Ben, Maalej, H., Montero, V., Rinaudo, M., Dahia, M., Mechichi, T., Hajji, M., & Nasri, M. (2015). Structural, physicochemical and antioxidant properties of

sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *International Journal of Biological Macromolecules*, *72*, 1358–1367. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.10.016

Sellner, K. G., Doucette, G. J., & Kirkpatrick, G. J. (2003). Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection. Em *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 30, Número 7, pp. 383–406). https://doi.org/10.1007/s10295-003-0074-9

Setyawidati, N. A. R., Puspita, M., Kaimuddin, A. H., Widowati, I., Deslandes, E., Bourgougnon, N., & Stiger-Pouvreau, V. (2018). Seasonal biomass and alginate stock assessment of three abundant genera of brown macroalgae using multispectral high resolution satellite remote sensing: A case study at Ekas Bay (Lombok, Indonesia). *Marine Pollution Bulletin*, *131*, 40–48. https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2017.11.068

Shalumon, K. T., Anulekha, K. H., Nair, S. V., Nair, S. V., Chennazhi, K. P., & Jayakumar, R. (2011). Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*(3), 247–254. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2011.04.005

Silva, M., Gomes, F., Oliveira, F., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2015). *Microwave-Assisted Alginate Extraction from Portuguese Saccorhiza polyschides – Influence of Acid Pretreatment*.

Soares, J. P., Santos, J. E., Chierice, G. O., & Cavalheiro, E. T. G. (2004). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Ecletica Quimica*, *29*(2), 57–63. https://doi.org/10.1590/s0100-46702004000200009

Sobhanian, P., Khorram, M., Hashemi, S. S., & Mohammadi, A. (2019). Development of nanofibrous collagen-grafted poly (vinyl alcohol)/gelatin/alginate scaffolds as potential skin substitute. *International Journal of Biological Macromolecules*, *130*, 977–987. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.03.045

Sondermeijer, H. P., Witkowski, P., Woodland, D., Seki, T., Aangenendt, F. J., Van Der Laarse, A., Itescu, S., & Hardy, M. A. (2016). Optimization of alginate purification using polyvinylidene difluoride membrane filtration: Effects on immunogenicity and biocompatibility of three-dimensional alginate scaffolds HHS Public Access. *J Biomater Appl*, *31*(4), 510–520. https://doi.org/10.1177/0885328216645952

Taemeh, M. A., Shiravandi, A., Korayem, M. A., & Daemi, H. (2020). Fabrication challenges and trends in biomedical applications of alginate electrospun nanofibers. Em *Carbohydrate Polymers* (Vol. 228). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115419

Tang, Y., Lan, X., Liang, C., Zhong, Z., Xie, R., Zhou, Y., Miao, X., Wang, H., & Wang, W. (2019). Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, *219*, 113–120. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.05.004

Tarun, K., & Gobi, N. (2012). Calcium alginate/PVA blended nano fibre matrix for wound dressing. *Volume 37, Issue 2, Pages 127 - 132*, *37*(2), 127–132.

Thomas, A., Harding, K. G., & Moore, K. (2000). Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor-α *Biomaterials*, *21*(17), 1797–1802. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00072-7

Torabi, P., Hamdami, N., & Keramat, J. (2022). Microwave-assisted extraction of sodium alginate from brown macroalgae Nizimuddinia zanardini, optimization and physicochemical properties. *Separation Science and Technology*, *57*(6), 872–885. https://doi.org/10.1080/01496395.2021.1954020

Ummat, V., Sivagnanam, S. P., Rajauria, G., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2021). Advances in pre-treatment techniques and green extraction technologies for bioactives from seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 90–106. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.01.018

Vale, M. A. (2020). *CO2 capture using microalgae*.

Vauchel, P., Leroux, K., Kaas, R., Arhaliass, A., Baron, R., & Legrand, J. (2009). Kinetics modeling of alginate alkaline extraction from Laminaria digitata. *Bioresource Technology*, *100*(3), 1291–1296. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2008.03.005

Wnek, G. E., Carr, M. E., Simpson, D. G., & Bowlin, G. L. (2003). *Electrospinning of Nanofiber Fibrinogen Structures*. https://doi.org/10.1021/nl025866c

Wongkanya, R., Chuysinuan, P., Pengsuk, C., Techasakul, S., Lirdprapamongkol, K., Svasti, J., & Nooeaid, P. (2017). Electrospinning of alginate/soy protein isolated nanofibers and their release characteristics for biomedical applications. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, *2*(3), 309–316. https://doi.org/10.1016/J.JSAMD.2017.05.010

Youssouf, L., Lallemand, L., Giraud, P., Soulé, F., Bhaw-Luximon, A., Meilhac, O., D'Hellencourt, C. L., Jhurry, D., & Couprie, J. (2017). Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. *Carbohydrate Polymers*, *166*, 55–63. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.01.041

Yu, C. C., Chang, J. J., Lee, Y. H., Lin, Y. C., Wu, M. H., Yang, M. C., & Chien, C. T. (2013). Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering. *Materials Letters*, *93*, 133–136. https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2012.11.040

Yu, D. G., Shen, X. X., Branford-White, C., White, K., Zhu, L. M., & Annie Bligh, S. W. (2009). Oral fast-dissolving drug delivery membranes prepared from electrospun polyvinylpyrrolidone ultrafine fibers. *Nanotechnology*, *20*(5), 055104. https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/5/055104

Yuan, Y., & Macquarrie, D. J. (2015). Microwave assisted step-by-step process for the production of fucoidan, alginate sodium, sugars and biochar from Ascophyllum nodosum through a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, *198*, 819–827. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.09.090

Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S. O., Jafari, S. H., & Supaphol, P. (2010). A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies*, *21*(2), 77–95. https://doi.org/10.1002/PAT.1625

Zhang, J., Wang, X. X., Zhang, B., Ramakrishna, S., Yu, M., Ma, J. W., & Long, Y. Z. (2018). In Situ Assembly of Well-Dispersed Ag Nanoparticles throughout Electrospun Alginate Nanofibers for Monitoring Human Breath - Smart Fabrics. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *10*(23), 19863–19870. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.8B01718/ASSET/IMAGES/LARGE/AM-2018-017183_0007.JPEG