

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALGINATO DE SODIO DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera*

Yerald Ore B., E. Renzo Pichilingue L., Ana C. Valderrama Negrón^a

RESUMEN

En el presente trabajo se propuso un proceso de extracción de alginato de sodio, el cual fue obtenido a partir de la macroalga parda *Macrocystis pyrifera* recolectada en La Punta-Callao. El proceso de extracción presentó un rendimiento del 12 % y el alginato obtenido fue caracterizado mediante las técnicas de IR-TF y RMN ¹³C en estado sólido, el cual fue comparado con un alginato comercial. Se ha llevado a cabo la evaluación de la presencia de bloques manurónicos y gularónicos IR-TF, mediante el uso de la 2da derivada obteniendo señales características a 894 cm⁻¹ para C₁-H α-L-gularónico del alginato extraído de la macroalga *Macrocystis pyrifera* (AlgM) y a 885 cm⁻¹ para la región anomérica C₁-H del β-D-manurónico para el alginato comercial de Sigma Aldrich (AlgC). Asimismo, se asignaron señales características para el espectro del alga a 902 cm⁻¹ y a 812 cm⁻¹ correspondiente a vibraciones de los bloques α-L-gularónico. Mediante ¹³C RMN en estado sólido se obtuvo un pico característico a 102,4 ppm para AlgM asociado al carbono anomérico C₁-H α-L-gularónico, mientras que en AlgC se visualizaron dos picos a 101,8 ppm y a 99,8 ppm asignados a C₁-H α-L-gularónico y C₁-H β-D-manurónico, respectivamente, indicando así la presencia tanto de bloques G y bloques M en el alginato comercial.

Palabras clave: alginato, extracción, *Macrocystis pyrifera*, ¹³C RMN en estado sólido.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SODIUM ALGINATE FROM THE MACROALGAE *Macrocystis pyrifera*

ABSTRACT

In the present work, it was proposal a process for the extraction of sodium alginate, which was obtained from the brown macroalgae *Macrocystis pyrifera* collected in La Punta-Callao. The extraction process presented a yield of 12 % and the alginate obtained was characterized by FT-IR and ¹³C NMR techniques in solid state, which was compared with a commercial alginate. The evaluation of the presence of mannuronic and guluronic blocks has been carried out through the use of the 2nd derivative, obtaining characteristic signals at 894 cm⁻¹ for C₁-H

^a LIBIPMET, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru-Rímac, Lima, Perú, anitacvn29@yahoo.com.mx

α -L-guluronic in AlgM and at 885 cm⁻¹ for C₁-H anomeric region of the β -D-mannuronic in AlgC. Moreover, characteristic signals were assigned for the algae spectrum at 902 cm⁻¹ and at 812 cm⁻¹ corresponding to vibrations of the α -L-guluronic blocks. By ¹³C NMR in solid state, a characteristic peak was obtained at 102.4 ppm for AlgM associated with the anomeric carbon C₁-H α -L-guluronic, while in AlgC two peaks were visualized at 101.8 ppm and 99.8 ppm assigned to the C₁-H α -L-guluronic and C₁-H β -D-mannuronic respectively thus indicating the presence of both G blocks and M blocks in commercial alginate.

Key words: Alginate, Extraction, *Macrocystis pyrifera*, ¹³C NMR in solid state.

INTRODUCCIÓN

Actualmente las algas marinas constituyen un sector importante de la economía mundial, esto se debe a las múltiples aplicaciones que tienen, entre ellas su uso en la industria alimentaria y biotecnológica. Estas, son fuente principal de ficocoloides, siendo los más representativos el agar-agar, fucanos, carragenano y alginato¹.

Las algas pardas se caracterizan por encontrarse en mares templados o subpolares, predominando estas en la zona intermareal, caracterizadas por el tamaño de sus tallos y conformando así extensos bosques marinos, en donde la *macroalga Macrocystis pyrifera* es una de las especies más abundante del litoral peruano y a nivel mundial².

Asimismo, esta especie es uno de los insumos de mayor demanda en países tales como EE.UU., Japón, China, Francia y Noruega para la producción de alginato de sodio³.

El alginato es un polisacárido el cual es obtenido a partir de las macroalgas pardas y está principalmente compuesto por los ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) figura 1, los cuales se encuentran distribuidos de manera aleatoria en la estructura de la cadena polimérica. Además, el alginato puede presentar secuencias de monómeros de los residuos M y G, así como su alternancia de los mismos obteniendo de esta manera bloques M y bloques G (homopoliméricos), y bloques MG (heteropolimérico)⁴.

La relación del porcentaje de la distribución de los bloques M y G depende de la especie de la cual se obtiene el alginato. Asimismo, parámetros como la localización geográfica, hábitat, y especie determinan la distribución de estos grupos teniendo efecto en las propiedades fisicoquímicas de acuerdo a la relación M/G del alginato obtenido⁵.

Por otro lado, las etapas para llevar a cabo la extracción del alginato influyen en el tipo de alginato obtenido, teniendo un efecto en el tamaño molecular, variación en el contenido de los ácidos urónicos, contenido de iones metálicos, y la presencia de polifenoles⁶.

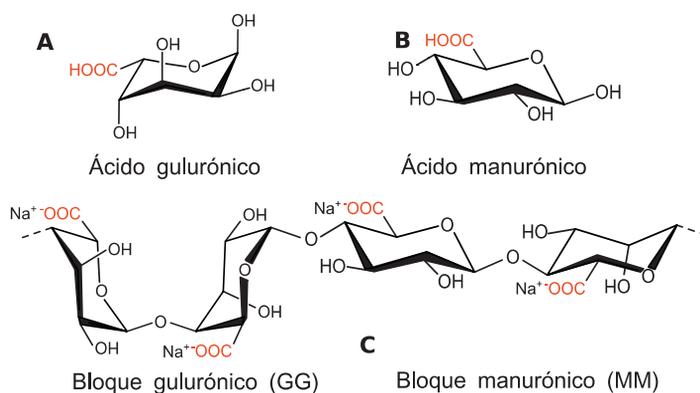


Figura 1. (A) Ácido galurónico. (B) Ácido manurónico. (C) Composición del alginato con bloques GG y Bloques MM⁴.

En consecuencia, estas propiedades podrían definir el uso versátil de este polisacárido en distintos campos, así como sus derivados, presentando actividad biológica, biodegradabilidad y biocompatibilidad en sistemas vivos, en su actividad como agente anti-incrustante, intercambiador iónico (para un M/G < 1), entre otros, fines de aplicación industrial^{4,7}.

Es de este modo que, a lo largo de los últimos años, se han propuesto distintas metodologías para la extracción y purificación del alginato, mediante la obtención de ácido alginico⁸, a partir de la formación de geles mediante CaCl₂⁹, implementación de un pre-tratamiento⁵, entre otros, las cuales en su mayoría se enfocan en optimizar el rendimiento de la extracción.

En el presente trabajo, se ha propuesto un proceso de extracción del alginato a partir del método alcalino y la formación de geles haciendo uso de CaCl₂, teniendo como principal objetivo la caracterización del biopolímero mediante técnicas de IR-TF y su segunda derivada, y mediante ¹³C RMN en estado sólido para evaluar el contenido de los bloques M y G presentes en el alginato, lo cual nos permitirá estimar si la relación M/G es menor o mayor a 1.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES

El alginato de sodio (AlgC) fue adquirido de Sigma Aldrich Chemistry (St. Louis, MO, USA), Los solventes utilizados fueron de grado analítico adquiridos de MERCK (Darmstadt, Germany); La *Macrocystis pyrifera* fue colectada entre 5-10 m de profundidad a 16°C en la La Punta-Callao. Una vez llevado a cabo esto, se lavaron y almacenaron a -20°C. Las hojas que han sido usadas como materia prima para la producción de alginato fueron cortadas en trozos pequeños y secados en una estufa a 70°C por 3 h. Finalmente, esta fue molida a un tamaño menor a 1 mm.

EXTRACCIÓN DEL ALGINATO

Se tomaron 50 g de alga pulverizada y se procedió a colocarla en una solución de n-hexano en relación (1:3) por 2 horas. Luego los trozos desengrasados (por el tratamiento con n-hexano) se colocaron en una mezcla etanol/formaldehído (4:1) dejando reposar por 72 h. El producto obtenido fue tratado con carbonato de sodio al 3 % a 90°C por 4h (proceso de extracción alcalino)¹⁰. Finalmente se dializó y liofilizó la fase líquida obtenida del proceso de extracción.

Asimismo, la purificación fue llevada a cabo mediante el uso de CaCl_2 (formación de geles). A partir del producto obtenido se realizó un intercambio de la forma sal/ácida del alginato, variando el pH alcalino/ácido. Finalmente, el producto obtenido fue dializado y liofilizado, obteniendo un sólido blanco, $\text{AlgM}^{6,8,11}$.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (IR-TF)

El espectro infrarrojo fue obtenido usando un FT-IR IRPrestigy-21 mediante el método de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros fueron medidos (64 scans/muestra) en el rango de 4000-700 cm^{-1} , con una resolución de 4,0 cm^{-1} . La derivatización incluyó el algoritmo de Savitzky-Golay con 23 puntos de suavizado y todos los espectros fueron analizados con el software OriginLab 9.0.

¹³C RMN EN ESTADO SÓLIDO

El análisis de RMN ¹³C en estado sólido fue llevado a cabo usando un equipo Bruker Advance III-400, operando a 9,4 T de campo magnético, $\nu(1\text{H}) = 400\text{ MHz}$. La ¹³C frecuencia de resonancia fue de 100.57 MHz con un pulso de secuencia (polarización cruzada con un ángulo mágico de spin, CP-MAS) y con una supresión total de banda (CP-MAS-TOSS). El alto poder de desacoplamiento del campo fue de 83.3KHz [P90 (1H) =3 μs] y se usó “adamantano” como patrón de referencia externo para ajustar el desplazamiento del ¹³C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXTRACCIÓN DEL ALGINATO

El proceso de extracción fue propuesto a partir de los trabajos de Matsuhiro *et al.*¹² y Hernández-Carmona *et al.*¹⁰ el cual consistió en 3 etapas; i. Pre-tratamiento, ii. Extracción alcalina y iii. Purificación.

El primer paso fue someter el alga pulverizada a un pre-tratamiento, que consistió en un desengrasado a partir del uso de n-hexano, seguido de una eliminación de metabolitos (taninos, polifenoles, etc.) mediante un tratamiento con la mezcla etanol/formaldehído en relación de 4/1. A partir de la muestra obtenida, se procedió a llevar a cabo la extracción en medio alcalino (carbonato de sodio al 3 %) el cual permitió extraer los polisacáridos presentes en la pared celular del alga, manteniendo una temperatura de 90°C por 4 horas, obteniéndose finalmente así un extracto impuro (figura 2) del cual se aislaron 2 fases mediante centrifugación por 30 min y finalmente el líquido obtenido, fue liofilizado para su pronta purificación.

De la purificación se obtuvo el ácido alginico, después de remover las impurezas presentes, ya que no solamente podríamos a ver aislado alginato de sodio el cual es el biopolímero en interés sino también, hemicelulosa, fucanos, carbohidratos, entre otros¹³. Es de este modo que se implementó dentro del proceso de purificación, la formación de geles con Ca^{+2} (para la selectividad del alginato) y procesos de diálisis y centrifugación para la mayor purificación del alginato¹⁴. Obteniendo, de este modo, un material blanquecino, como podemos observar en la figura 3.

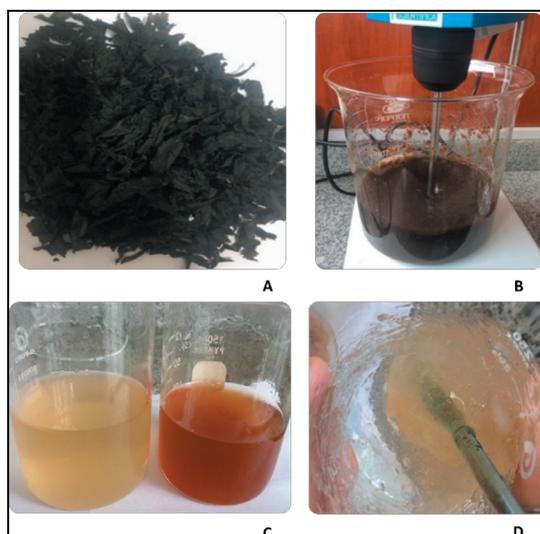


Figura 2. Extracción de alginato. (A) Materia prima, alga. (b) Tratamiento alcalino. (C) Comparación antes y después del alginato extraído y su purificación. (D) Intercambio de kps, en el proceso de purificación.



Figura 3. Alginato extraído de la macroalga *Macrocystis pyrifera*.

El rendimiento obtenido del proceso de extracción propuesto del alga fue del 12 % para la *Macrocystis pyrifera*. El protocolo propuesto permitió obtener un alginato de coloración blanquecina, lo que indicaría que en el proceso se pudo eliminar gran contenido de polifenoles, presentes en el alga parda de partida. A pesar de esto, el rendimiento no fue tan alto a comparación de las obtenidas para otras algas ya reportadas^{15,16}. Esto, posiblemente es debido, al ambiente natural, estación de la cosecha³, entre otros factores que involucran al entorno del crecimiento del alga. Asimismo, otro factor que influiría en el rendimiento, serían los pasos tomados en cada etapa del proceso de extracción, ya que cada tratamiento es determinante y no solo involucra la extracción del alginato, sino también la influencia en la degradación del mismo, debido al tratamiento de hidrólisis (ácida o básica)¹⁷ que ocurre a lo largo de la cadena del biopolímero, disminuyendo así su masa molecular modificando las propiedades que podría presentar, influenciadas estas por la secuencia de los bloques M y G y su proporción M/G presente en la cadena polimérica.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (IR-TF)

En la figura 4 presentamos los espectros del alga de partida (*Macrocystis pyrifera*), el alginato extraído (AlgM) y el alginato comercial de Sigma Aldrich (AlgC), de este modo podemos asignar los grupos funcionales acorde a las vibraciones que presenta la figura 4. En este caso las señales características del alginato más representativas son:

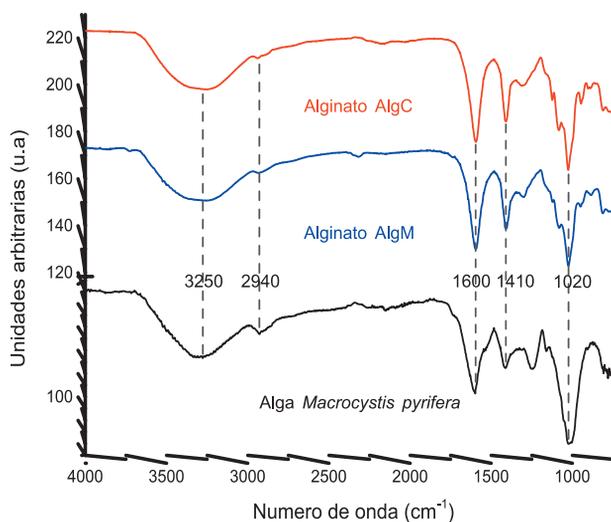


Figura 4. Espectro IR-TF del Alga *Macrocystis pyrifera*, Alginato AlgM y Alginato AlgC.

La señal alrededor de 3250 cm^{-1} y 2940 cm^{-1} correspondientes a la vibración de estiramiento del grupo funcional O-H y C-H, respectivamente, ambos presentes a lo largo de la cadena del alginato. Además, alrededor de 1600 cm^{-1} y 1410 cm^{-1} se observa la vibración antisimétrica y simétrica respectivamente, del grupo carboxilato. Entre 1300 a 1000 cm^{-1} podemos asociar las señales características de las vibraciones de estiramiento de C-C-H, O-C-H, C-O-C, entre otros, asociados al entorno de la piranosa, siendo la más representativa la banda 1020 cm^{-1} asociada a la vibración de estiramiento C-O-C de la piranosa⁷.

Por otro lado, en el caso del espectro de la macroalga *Macrocystis pyrifera*, presentamos a 1540 cm^{-1} una banda atribuida a la vibración de estiramiento de grupo amida (N-H), esto debido a la presencia de proteínas. Asimismo, a 1750 cm^{-1} asignamos la señal del grupo C=O el cual caracteriza a la presencia de lípidos. Finalmente, a 1250 cm^{-1} encontramos una banda que representa a la vibración de estiramiento del grupo S=O, característico a la presencia de otros polisacáridos presentes en el alga¹⁸.

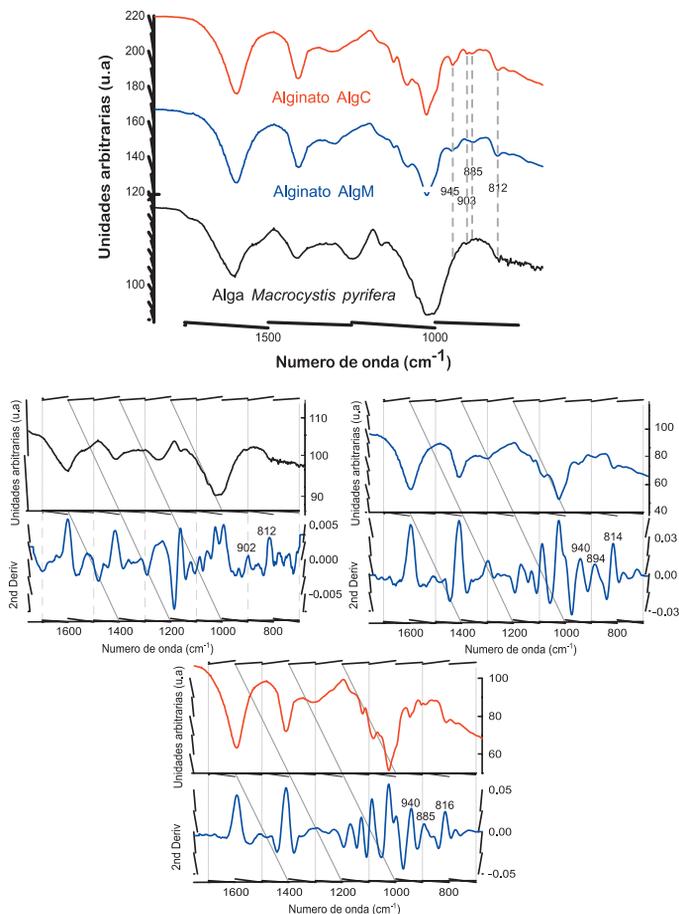


Figura 5. Espectro FT-IR y su segunda derivada en la región de la huella dactilar.

En el entorno de la huella dactilar podríamos atribuir bandas asociadas a los bloques homopoliméricos tanto de GG y MM. Evaluando las señales entre 1200 a 750 cm^{-1} (figura 5) observamos bandas características a 945 cm^{-1} , la cual es asignada a las vibraciones C-O, con contribución de C-C-O debido a la deformación vibracional de los residuos de los ácidos urónicos presentes en ambos alginatos. Las bandas a 903 y 885 cm^{-1} son asignadas a las vibraciones de deformación de $\text{C}_1\text{-H}$ $\alpha\text{-L-gulurónico}$ y $\text{C}_1\text{-H}$ del $\beta\text{-D-manurónico}$. Asimismo, a 812 cm^{-1} ambos alginatos presentan esta banda característica de deformación de la piranosa de los bloques $\alpha\text{-L-gulurónico}$ ^{7,14}.

Por otro lado, para evaluar significativamente las diferencias que existen en estos espectros se procedió a realizar la 2da derivada (figura 5) para visualizar aquellas señales que no son fácilmente observables en el espectro común, tales como las interacciones para cada bloque MM y GG. Es así que tenemos para AlgM la banda a 894 cm^{-1} la cual es característica a la vibración de la región anomérica $\text{C}_1\text{-H}$ $\alpha\text{-L-gulurónico}$ a diferencia de AlgC el cual presenta una banda a 885 cm^{-1} característico a la vibración de la región anomérica $\text{C}_1\text{-H}$ del $\beta\text{-D-manurónico}$ ^{7,11}.

Ambos alginatos presentaron señales a 940 cm^{-1} , lo cual fue asignado a la vibración de estiramiento C-O. Finalmente, en el caso del espectro de la macroalga, podemos observar las señales a 902 cm^{-1} y a 812 cm^{-1} característicos a la deformación de la piranosa de los bloques $\alpha\text{-L-gulurónico}$ pudiendo interpretar la presencia de los bloques GG antes de llevar a cabo el proceso de extracción del alginato.

Por lo tanto, de los resultados obtenidos, tenemos que el AlgM y AlgC presentan diferencias respecto a la relación del contenido de bloques M y G ya que se han observado diferencias en las bandas que corresponden $\text{C}_1\text{-H}$ $\alpha\text{-L-gulurónico}$ y $\text{C}_1\text{-H}$ del $\beta\text{-D-manurónico}$ presentes en la cadena polimérica, los cuales serán mejor diferenciados mediante el ensayo de Resonancia Magnética Nuclear.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN ESTADO SÓLIDO

La figura 6 muestra el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido del AlgM y AlgC

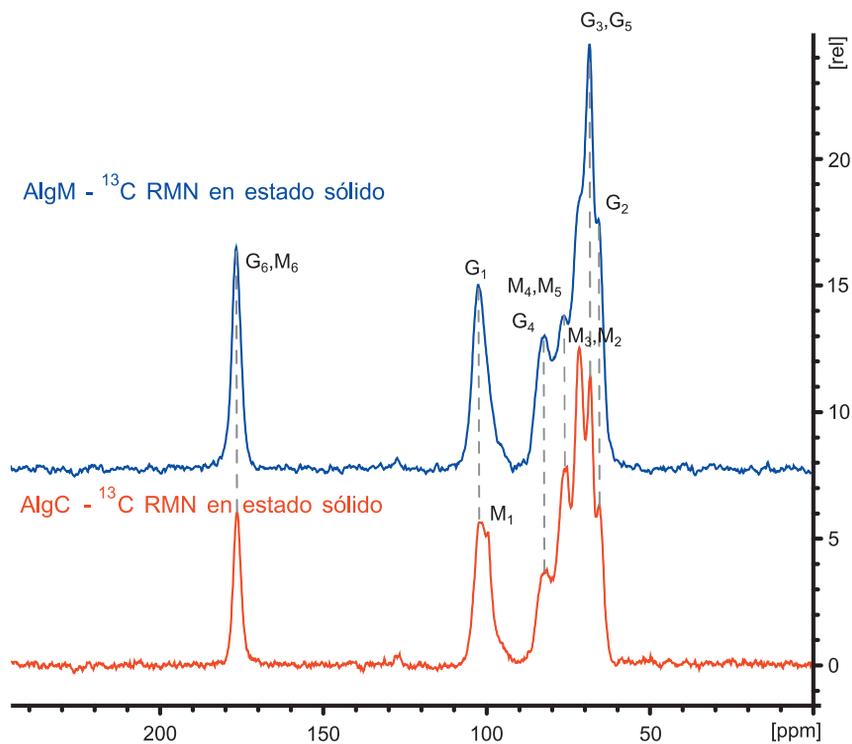


Figura 6. Análisis RMN ^{13}C en estado sólido de AlgM y AlgC.

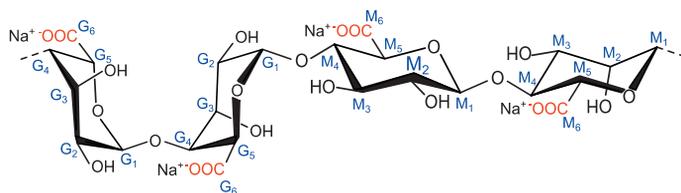


Figura 7. Estructura del alginato con cada carbono enumerado.

En la tabla 1 se muestran los desplazamientos químicos obtenido a partir del RMN ^{13}C en estado sólido de la figura 6.

- Los grupos carboxilatos (160 – 180 ppm)
- Puente glicosídico (90 – 110 ppm)
- Entorno de la piranosa (50 – 80 ppm)

Tabla 1. Asignación de los espectros RMN ^{13}C en estado sólido de la figura 6 tomando en consideración la estructura del alginato mostrado en la figura 7.

Ambiente Químico	Carbonilo	Anomérico	Piranosas							
Carbones de los grupos manurónicos (M) y gulurónicos (G)	G ₆ M ₆	G ₁ M ₁	G ₄ M ₄ M ₅ M ₃ M ₂ G ₃ G ₅ G ₂							
D. Químico AlgC (ppm)	176,4	101,8 99,4	82,1 75,7 71,7 68,3 65,5							
D. Químico AlgM (ppm)	176,1	102,4 ---	81,6 75,6 71,6 68,2 65,4							
Desplazamiento Químico (ppm) ¹⁹	176,3	102,2 99,5	82,8 76,4 71,6 68,4 65,5							

Evaluando las diferencias entre AlgM y AlgC, obtenido de la tabla 1 y de la figura 7, tenemos que la presencia de los carbonos G son más representativos en AlgM que en AlgC. Como se ha mencionado anteriormente, el entorno entre 110 – 90 ppm evalúa los carbonos presentes en el puente glicosídico el cual determina la interacción y la formación de los bloques presentes. A 102,4 ppm tenemos al carbono anomérico C₁-H α -L-gulurónico que se observa en el AlgM desplazándose esta señal a un campo más bajo que el que presenta AlgC a 101,8 ppm. En el espectro de este último también se observa la señal del carbono anomérico C1-H del β -D-manurónico a 99,8 ppm indicando así la presencia característica de los bloques M, lo que no se observa en el AlgM.

Asimismo, evaluando el entorno de la piranosas presentamos señales de los carbonos G₃-G₅ los cuales son más intensos que las señales de M₃ y M₂ para el AlgM, soportando así la propuesta que este alginato presenta un mayor % de grupos G. A diferencia de esto tenemos que en AlgC, se presenta señales más intensas alrededor de M₃ y M₂ y el pico que caracteriza a G₃-G₅ la señal es casi indistinguible.

Por ende, a partir de estos análisis podemos interpretar que la relación M/G para el AlgM es <1 y para el AlgC >1. De la misma manera, nos permite proponer que para el AlgM existe un mayor porcentaje de bloques G a diferencia del AlgC. A partir de estos resultados, con el AlgM se podría obtener materiales que se beneficien a partir de la propiedad de reticulación iónica a diferencia de AlgC, debido a la mayor presencia de bloques GG en la estructura del alginato de AlgM. A pesar de ello, la presencia de bloques M a diferencia de los bloques G, son menos reactivos y por tanto son más estables frente a procesos de modificación y degradación^{7,20}.

CONCLUSIONES

Se logró extraer alginato sodio, el cual presentó un rendimiento del 12 %. Para el alginato obtenido de la macroalga (AlgM) se logró demostrar la presencia de carbonos y grupos que asocian a la región anomérica del C₁-H α-L-gulurónico. Asimismo, el espectro del alga, mostró bandas a 902 cm⁻¹ y a 812 cm⁻¹ característicos de los bloques G lo que indicaría que esta macroalga es rica en grupos gulurónicos a diferencia del alginato comercial (AlgC). Finalmente, mediante los resultados obtenidos se interpretaría que la relación M/G para AlgM sería <1 y para AlgC >1.

Es así que ambas técnicas (IR-TF y RMN en estado sólido) nos permiten diferenciar la presencia de bloques M y G, así como poder interpretar antes de llevar a cabo la extracción de alginato, la presencia de bloques gulurónicos en la macroalga.

AGRADECIMIENTO

Al Lic. Ronny G. Huamaní Palomino, por su contribución en las discusiones del IR-TF y ¹³C RMN en estado sólido. Asimismo, al Vicerrectorado de Investigación y a la Oficina de Gestión de la Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería por el financiamiento del proyecto FC-F-13-2018.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Øverland M, Mydland LT, Skrede A. Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *J Sci Food Agric*. 2019; 99(1):13-24.
2. Baweja P, Kumar S, Sahoo D, Levine I. Biology of Seaweeds. In: Fleurence J, Levine I. *Seaweed in Health and Disease Prevention*. London: Academic Press; 2016. p 41-106.
3. Peteiro C. Alginate Production from Marine Macroalgae, with Emphasis on Kelp Farming. In: Rehm B, Moradali M. (eds) *Alginates and Their Biomedical Applications*. Singapore: Springer; 2018. p 27-66.
4. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106-126.
5. Arvizu-Higuera DL. Parameters affecting the conversion of alginic acid to sodium alginate. *Ciencias Mar*. 2002; 28(1):27-36.
6. Hernández-Carmona G, Freile-Pelegrín Y, Hernández-Garibay E. Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. In: Dominguez H. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing; 2013. p 475-516.
7. Huamaní-Palomino RG, Jacinto CR, Alarcón H, Mejía IM, López RC, Silva D de O, *et al*. Chemical modification of alginate with cysteine and its application for the removal of Pb(II) from aqueous solutions. *Int J Biol Macromol*. 2019;129: 1056-1068.

8. Chandía NP, Matsuhiro B, Mejías E, Moenne A. Alginic acids in *Lessonia vadosa*: Partial hydrolysis and elicitor properties of the polymannuronic acid fraction. *J Appl Phycol*. 2004;16(2):127–133.
9. Reyes Tisnado R, Hernández Carmona G, Rodríguez Montesinos E, Arvizu Higuera D, López Gutiérrez F. Food grade alginates extracted from the giant kelp *Macrocystis pyrifera* at pilot-plant scale. *Rev Investig Mar*. 2005;26(3):185–192.
10. Hernández-Carmona G, McHugh DJ, Arvizu-Higuera DL, Rodríguez-Montesinos YE. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. *J Appl Phycol*. 2002; 14(6):445-451
11. Chandía NP, Matsuhiro B, Vásquez AE. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: Characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydr Polym*. 2001;46(1):81–87.
12. Martínez-Gómez F, Guerrero J, Matsuhiro B, Pavez J. *In vitro* release of metformin hydrochloride from sodium alginate/polyvinyl alcohol hydrogels. *Carbohydr Polym*. 2017;155:182–191.
13. García-Vaquero M, Rajauria G, O'Doherty J V., Sweeney T. Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food Res Int*. 2017; 99(Part 3): 1011-1020.
14. Leal D, Matsuhiro B, Rossi M, Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr Res*. 2008;343(2):308–316.
15. Hagen Rødde RS, Vårum KM, Larsen BA, Myklestad SM. Seasonal and geographical variation in the chemical composition of the red alga *Palmaria palmata* (L.) Kuntze. *Bot Mar*. 2004;47(2):125–133.
16. Rhein-Knudsen N, Ale MT, Ajallouei F, Meyer AS. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp. *Food Hydrocoll*. 2017; 71: 236-244.
17. Draget KI, Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll*. 2011;25(2):251–256.
18. Kleinübing SJ, Gaia F, Bertagnolli C, Da Silva MGC. Extraction of alginate biopolymer present in marine alga *sargassum filipendula* and bioadsorption of metallic ions. *Mater Res*. 2013; 16(2):481–488.
19. Salomonsen T, Jensen HM, Larsen FH, Steuernagel S, Engelsen SB. Direct quantification of M/G ratio from ^{13}C CP-MAS NMR spectra of alginate powders by multivariate curve resolution. *Carbohydr Res*. 2009;344(15):2014–2022.
20. Gómez CG, Rinaudo M, Villar MA. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr Polym*. 2007; 67(3): 296–304.