



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NÁYRA DE OLIVEIRA FREDERICO PINTO

NANOCELULOSE BACTERIANA:
PROCESSOS DE OBTENÇÃO E APLICAÇÃO EM SISTEMAS DE EMULSÃO
PICKERING PARA ALIMENTOS

FORTALEZA

2024

NÁYRA DE OLIVEIRA FREDERICO PINTO

NANOCELULOSE BACTERIANA:
PROCESSOS DE OBTENÇÃO E APLICAÇÃO EM SISTEMAS DE EMULSÕES
PICKERING PARA ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Morsyleide de Freitas Rosa.

Coorientador: Prof.^a Dr.^a. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo.

FORTALEZA

2024

Página reservada para ficha catalográfica.

Utilize a ferramenta *online* Catalog! para elaborar a ficha catalográfica de seu trabalho acadêmico, gerando-a em arquivo PDF, disponível para download e/ou impressão.

(<http://www.fichacatalografica.ufc.br/>)

NÁYRA DE OLIVEIRA FREDERICO PINTO

NÁYRA DE OLIVEIRA FREDERICO PINTO

NANOCELULOSE BACTERIANA:
PROCESSOS DE OBTENÇÃO E APLICAÇÃO EM SISTEMAS DE EMULSÕES
PICKERING PARA ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

da em: xx

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Morsyleide de Freitas Rosa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho
Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura (EMBRAPA) – Fortaleza CE

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Tiago de Lima Albuquerque
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Fábiana Karine Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, Criador de toda ciência e sabedoria.

Aos meus pais, meu esposo e filhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força e determinação durante a minha jornada, mas também me proporcionar o seu aconchego, amor, cuidado e proteção que tanto precisei. Devo à Ele tudo o que tenho e o que sou.

Aos meus pais que me incentivaram a seguir os meus sonhos e alcançá-los. Pelos ensinamentos que me fizeram trilhar em passos seguros. Tê-los perto nesse momento é um imenso privilégio para mim. Aqui dedico a minha retribuição por todo o vosso esforço, dedicação e cuidado que me fizeram crescer. Às minhas irmãs pelo amor e apoio.

Ao meu esposo Daniel, por me fazer feliz e completa. Por construirmos juntos um amor sólido e por fazer ele perdurar por gerações através dos nossos filhos. Pelo apoio incondicional, abraços, encorajamento e amor que me foram tão importantes. Aos meus filhos pelo amor e sorriso que me fortaleceram a cada dia.

À minha orientadora Morsy, por estar comigo durante esse caminho, pela amizade e por me fazer crescer e me ensinar mais sobre ciência e sobre a vida. Por me tirar da minha zona de conforto e me encorajar. Agradeço-lhe por confiar em mim e em meu potencial.

À minha co-orientadora Ette, por mostrar que estava ao meu lado com sua leveza e acolhimento. Por junto com a Morsy confiar em meu trabalho.

À minha orientadora Catarina, por me acolher carinhosamente no International Iberian Nanotechnology Laboratory e pela amizade construída. Pelos momentos de construção de ideias e discussão, e por estar sempre ao meu lado dando o apoio e suporte necessários.

À Isa Bourbon e ao Miguel Cerqueira por também me acompanharem na orientação, e por se mostrarem sempre solícitos. Agradeço-lhes pelo conhecimento agregado e pelos bons momentos compartilhados!

Ao Professor Miguel Gama por participar de momentos importantes de discussão sobre minha investigação, por me acolher junto com a Daniela Martins no Centro de Engenharia Biológica, durante a fase inicial de desenvolvimento do meu projeto. Agradeço-lhes por compartilhar vossas considerações e conhecimento sobre o tema numa área que ainda me era desconhecida. Foi muito bom dividir esse tempo com vocês!

Ao Dr Edy, Dra Fábila, Professor Ivanildo, Professor Tiago e Dr Men de Sá por comporem as minhas bancas de qualificação e defesa, pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões que tornaram possível a concretização deste trabalho.

Aos professores e pesquisadores Adriano Lincoln (Embrapa), Celli Muniz (Embrapa), Paula Pereira (CEB), Lorenzo Pastrana (INL), Sabela Amado (INL), Claudia Nunes (Universidade do Porto), por disponibilizar equipamentos, tempo e atenção em análises essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho.

A todos os amigos que estiveram presente em minha jornada, aos antigos e aos novos. Pessoas que estiveram envolvidas e contribuíram em alguma medida para o trabalho aqui apresentado, tornando-a mais leve e divertida. Em especial à Jéssica Rocha, Sarah Frota, André Luís e Lorena Soares. É muito bom tê-los ao meu lado!

Aos amigos que me incentivaram e me apoiaram com carinho Suzana Hikichi, Catarina Miranda, Catarina Moura, Alexandra Azevedo, Miguel Xavier, Marta Vinha, Cris Andrade, Efres Belmonte e Alar Ainla.

Ao Departamento de Engenharia Química, pela vivência única e por ser também parte desta conquista. Especialmente ao Professores Fabiano, Mardônio e Ivanildo, coordenadores sempre presentes e solícitos, pela prontidão em esclarecer, ajudar e solucionar cada vez que era preciso.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical, por me receber desde a minha iniciação científica e conceder a realização de todo meu trabalho, em especial ao Laboratório de Tecnologia da Biomassa.

À Instituição Fundação para a Ciência e a Tecnologia e à CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio FCT/CAPES 99999.008530/2014–09.

RESUMO

As emulsões pickering têm ganhado considerável atenção na indústria alimentícia como alternativa sustentável aos estabilizantes convencionais e à sua alta estabilidade. Diferentes partículas coloidais têm sido utilizadas para estabilizar as emulsões com formatos distintos, que exige a compreensão das características tecnofuncionais das partículas e dos processos envolvidos no desempenho prático dos sistemas de emulsões. Dentre as macromoléculas naturais, os recursos celulósicos têm atraído grande atenção devido à sua renovabilidade e degradabilidade. Dessa forma, foi realizado um estudo sistemático do processamento e caracterização de nanoceluloses bacteriana, nomeadamente nanocristais e nanofibrilas, com o objetivo de compreender e validar sistemas mais verdes e escalonáveis de emulsões pickering voltados para a indústria de alimentos. As nanoceluloses em suspensão ou em pó foram avaliadas quanto às suas características morfológicas, funcionalização, molhabilidade, tensão interfacial e cristalinidade. A aplicação das nanoceluloses em sistemas de emulsões pickering ocorreu usando os métodos de emulsificação por alto cisalhamento, ultrassom e microfluidizador de alta pressão. O tipo, a concentração e densidade de carga superficial das nanoceluloses influenciaram na formação e estabilidade de emulsões pickering. A neutralização balanceada de nanocristais por NaOH substituiu efetivamente o uso de diálise por membrana, não alterando suas propriedades tecnológicas, mantendo-os adequados para a estabilização de emulsões. O processamento de CMC (carboximetilcelulose) juntamente com as fibrilas de celulose bacteriana propiciou um tipo de funcionalização por contato que pode substituir o uso de funcionalização química pelo catalizador TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil), que demanda menor tempo de processo. A secagem por spray dryer originou nanocristais e nanofibrilas de celulose bacteriana completamente redispersíveis, não alterando suas propriedades tecnológicas. As novas abordagens de processamento permitiram a produção de suspensões de nanoceluloses bacteriana estáveis através de processos escalonáveis e aptas para a aplicação em sistemas de emulsões pickering na indústria.

Palavras-chave: celulose bacteriana; emulsificante; nanocristais; nanofibrilas; produção em escala

ABSTRACT

Pickering emulsions have gained considerable attention in the food industry as a sustainable alternative to conventional stabilizers due to their high stability. Different colloidal particles have been used to stabilize emulsions with distinct structures, which requires an understanding of the techno-functional characteristics of the particles and the processes involved in the practical performance of emulsion systems. Among natural macromolecules, cellulosic resources have attracted great attention due to their renewability and degradability. Therefore, a systematic study was conducted on the processing and characterization of bacterial nanocellulose, specifically nanocrystals and nanofibrils, with the aim of understanding and validating greener and scalable Pickering emulsion systems for the food industry. Nanocellulose in suspension or powder form was evaluated for its morphological characteristics, functionalization, wettability, interfacial tension, and crystallinity. The application of nanocellulose in Pickering emulsion systems was carried out using high-shear emulsification, ultrasound, and high-pressure microfluidizer methods. The type, concentration, and surface charge density of the nanocellulose influenced the formation and stability of Pickering emulsions. The balanced neutralization of nanocrystals with NaOH effectively replaced the use of membrane dialysis, without altering their technological properties, making them suitable for emulsion stabilization. The processing of CMC (carboxymethylcellulose) along with bacterial cellulose fibrils enabled a type of contact functionalization that can replace chemical functionalization using TEMPO catalyst (2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy), requiring less processing time. Spray-drying produced fully redispersible bacterial cellulose nanocrystals and nanofibrils, without altering their technological properties. These new processing approaches allowed for the production of stable bacterial nanocellulose suspensions through scalable processes, making them suitable for application in Pickering emulsion systems in the industry.

Keywords: bacterial cellulose; emulsifier; nanocrystals; nanofibrils; scale production

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Rede de nanofibrilas de celulose produzidas por fermentação de bactérias	26
Figura 3.2	Imagem de microscopia eletrônica de varredura de <i>Acetobacter xylinus</i> e formação de nanocelulose bacteriana.....	27
Figura 3.3	Estrutura da celulose com destaque da unidade repetidora de celobiose entre colchetes	29
Figura 3.4	Aplicações da celulose bacteriana: (a) celulose I - curativos para feridas; (b) e celulose II – filme de celulose regenerada antibacteriano para embalagens de alimentos	32
Figura 3.5	Produção científica sobre nanocelulose de plantas e celulose bacteriana (2003-2024)	33
Figura 3.6	Abordagens de construção <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> de nanomateriais..	34
Figura 3.7	Biossíntese natural da rede de nanocelulose bacteriana <i>bottom-up</i> (a) e a sua desconstrução <i>top-down</i> para produção de nanofibrilas e nanocristais isolados (b).....	37
Figura 3.8	Imagem de microscopia eletrônica de varredura de celulose bacteriana antes e após diferentes tipos de tratamentos: (A) nanocelulose bacteriana natural (B) celulose bacteriana nanofibrilada por trituração (C) celulose bacteriana nanofibrilada por oxidação TEMPO (pré-tratamento químico) e trituração	38
Figura 3.9	Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de celulose bacteriana antes e após diferentes tipos de tratamentos: (BC) nanocelulose bacteriana natural, (CNC) nanocristais de celulose bacteriana por hidrólise com ácido sulfúrico e (D-CNC) nanocristais de celulose bacteriana por hidrólise com ácido sulfúrico e periodato de sódio	39
Figura 3.10	Emulsões Pickering formadas por partículas sólidas (celulose nanofibrilada e nanocristais de celulose) e a emulsão convencional formada por moléculas anfifílicas em interfaces óleo/água	62
Figura 3.11	Microscopia confocal de varredura a laser da emulsão de Pickering óleo em água estabilizada com nanocristais de algodão contendo 10%	

	de óleo e a emulsão HIPE resultante com 85,6% de óleo	71
Figura 4.1	Micrografias de TEM, diâmetro (d), comprimento (C), potencial zeta e ângulo de contato das CBNF (a) e CBNC (b). A barra de escala é de 5 μ m. As fotografias foram tiradas no dia seguinte à preparação...	114
Figura 4.2	Espectros FTIR das suspensões de CBNF e CBNC.....	116
Figura 4.3	(a) Tensão interfacial da interface óleo de girassol-água em diferentes concentrações de CBNF ou CBNC. (b) Tensão interfacial da interface óleo de girassol-água ou óleo isoexadecano-água, com uma concentração de 0,5 % de CBNF ou CBNC. (c) Ilustração da formação de filme surfactante de CBNF ou CBNC na interface óleo de girassol-água usando o método da gota pendente. Os valores reportados são as médias (n = 3). Valores seguidos por pelo menos uma letra comum não são significativamente diferentes (p > 0,05)....	118
Figura 4.4	Imagem de Cryo-SEM (a) de uma emulsão com baixa fração de óleo (1 %) estabilizada com 1 % de BC-NC e 50 mM de NaCl, e CLSM (b) de uma emulsão com 10 % de óleo incorporado com 0,05 % de beta-caroteno (verde), estabilizada com 1 % de CBNC (corado com Calcofluor - azul) e 50 mM de NaCl. A imagem mostra uma área de 512 $\times$ 512 μ m de um mosaico 4x4 capturado com um objetivo de 63x de ampliação.....	119
Figura 4.5	Microscopia óptica de emulsões de Pickering estabilizadas por BC-NF (0,5% ou 1% m/v) sob diferentes forças iônicas (0, 12,5 e 50 mM) após preparação ou após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente. A barra de escala é de 5 μ m.....	121
Figura 4.6	Microscopia óptica de emulsões de Pickering estabilizadas por BC-NC (0,5% ou 1% m/v) sob diferentes forças iônicas (0, 12,5 e 50 mM) após preparação ou após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente. As setas nas imagens de microscopia indicam as fases superior e inferior formadas. A barra de escala é de 5 μ m.....	121
Figura 4.7	Imagens de emulsões Pickering estabilizadas por CBNF (0,5 % ou 1 % m/v) sob diferentes forças iônicas (0, 12,5 e 50 mM) antes (30 mins após a emulsificação) e após centrifugação (1520 g por 2 mins). A microscopia óptica foi utilizada para avaliar as gotículas após a	

	centrifugação. Setas nas imagens de microscopia indicam as fases superior e inferior formadas. A barra de escala é 5 μm	124
Figura 4.8	Imagens de emulsões Pickering estabilizadas por CBNF (0,5 % ou 1 % m/v) sob diferentes forças iônicas (0, 12,5 e 50 mM) antes (30 min após a emulsificação) e após centrifugação (1520 g por 2 min). A microscopia óptica foi usada para avaliar as gotículas após a centrifugação. Setas nas imagens de microscopia indicam as fases superior e inferior formadas. A barra de escala é de 5 μm	125
Figura 4.9	Imagens de Cryo-SEM de emulsões com 0,5 % de CBNF (a, b, c) ou CBNC (d, e, f) sem sal (a, d), com 12,5 mM (b, e) ou 50 mM NaCl (c, f). As barras de escala são: a – 3 μm , b – 6 μm , c – 2 μm , d – 2 μm , e – 2 μm e f – 2 μm	127
Figura 4.10	Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para emulsões compostas por 0,5 % de CBNF (a) ou CBNC (b) sem sal (NaCl) (●) ou com diferentes concentrações de NaCl de 12,5 mM (●) e 50 mM (●).....	129
Figura 5.1	(a) Fluxogramas da produção da celulose nanofibrilada e (b) nanocristais de celulose.....	143
Figura 5.2	Espectros FTIR de CBNF-CMC e NCCB-NaOH.....	152
Figura 5.3	Imagens MET e histograma de frequência da distribuição das fibrilas de CB após desintegração em moinho coloidal antes (a) e após a adição de CMC (b). A barra de escala é de 25 μm	156
Figura 5.4	Imagens MET e histograma de frequência da distribuição dos tamanhos das fibrilas de CB após 1 ciclo (a), 5 ciclos (b) ou 10 ciclos de desintegração em microfluidizador. A barra de escala é de 10 μm ..	157
Figura 5.5	Imagem MET e histogramas de frequência da distribuição dos tamanhos dos nanocristais neutralizadas por NaOH. A barra de escala é de 2 μm	160
Figura 5.6	Padrão de difração de raios-X de CBNF-CMC e NCCB-NaOH.....	165
Figura 5.7	Fluxograma do processo de secagem (lado esquerdo) e produto seco de (a) CBNF-CMC e (b) NCCB-NaOH.....	167
Figura 5.8	Solubilidade em contato com a água no início da redispersão. CBNF-CMC (lado esquerdo) e NCCB-NaOH (lado direito).....	168

Figura 5.9	Dispersibilidade de CBNF-CMC e NCCB-NaOH (lado esquerdo e lado direito de cada letra, respectivamente): (a) suspensão antes da secagem, (b) dispersão por agitação manual, (c) agitação magnética à 45°C e (d) ultrassom (b-d dispersibilidade após 48h).....	169
Figura 5.10	Imagens de microscopia óptica das emulsões formadas por CBNF-CMC ou NCCB-NaOH. A barra de escala é 100 µm.....	171
Figura 5.11	Viabilidade de células fibroblastos murinos (L929) após incubação por 24 h ou 48 h a 37 °C de CBNF-CMC e NCCB-NaOH em diferentes concentrações (1%, 0,5%, 0,25%).....	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 –	Grau de polimerização da celulose de várias fontes.....	29
Tabela 3.2 –	Condições de purificação da celulose bacteriana.....	49
Tabela 3.3 –	Processos convencionais para obtenção de celulose nanofibrilada, método de processamento, pré-tratamento e área de aplicação.....	54
Tabela 3.4 –	Processos de hidrólise ácida para a obtenção de nanocristais de celulose aplicado a emulsões Pickering descrevendo o tipo de ácido e o tipo de neutralização.....	58
Tabela 3.5 –	Resumo de artigos científicos recentes que relatam produção de emulsões de Pickering estabilizadas por nanocelulose de grau alimentício.....	63
Tabela 4.1 –	Efeito da nanocelulose e da concentração de sal no tamanho das gotas de emulsões com baixa fração de óleo de girassol (1% v/v) ao longo do tempo.....	120
Tabela 4.2	Modelagem da curva de fluxo usando o modelo de Carreau (Eq. (2)) para emulsões de Pickering compostas de nanofibrilas de celulose (CBNF).....	129
Tabela 4.3	Modelagem da curva de fluxo usando o modelo de Carreau (Eq. (2)) para emulsões de Pickering compostas de nanocristais de celulose (NCCB).....	130
Tabela 5.1	Tamanhos de diâmetros médios das fibras obtidas no processo de obtenção da celulose nanofibrilada.....	154
Tabela 5.2	Índice de cristalinidade e tamanho do cristalito de CBNF-CMC e NCCB-NaOH.....	161

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AESA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ANOVA	Análise de Variância Unidirecional
ATR	reflexão total atenuada
BAA	bactérias ácido acético
BCNF	celulose bacteriana nanofibrilada
BHL	Balanço Hidrofílico-Lipofílico
CB	celulose bacteriana
CBNF-CMC	celulose bacteriana nanofibrilada-carboximetilcelulose
CLSM	Microscopia confocal de varredura a laser
CMC	Carboximetilcelulose
Cryo-SEM	Microscopia eletrônica de varredura criogênica
CT	complexos terminais
DHR1	Reômetro Híbrido Discovery
DLS	Dynamic Light Scattering
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek Theory
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raio-x
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EU	União Européia
EUA	Estados Unidos da América
FBS	soro fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
HIPE	emulsões com alta fase interna
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	índice de cristalinidade
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MFA	microscopia de força atômica

MO	Cidade de Missouri
NCCB	nanocristais de celulose bacteriana
NMMO	N-methylmorpholine N-oxide
RMN	Ressonância magnética nuclear
STEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão de Varredura
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl
UE	União Européia

LISTA DE SSÍMBOLOS

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	persulfato de amônio
~	aproximadamente
ΔE	energia de dessorção
μL	microlitro
μm	micrômetro
Au	ouro
C	comprimento
C/d	proporção de aspecto
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	ácido bromídico
cm	centímetro
cP	capacidade calorífica
d	diâmetro
$D_{(3,2)}$	diâmetro médio de sauter
di	diâmetro das partículas
g	unidade de aceleração (força g)
g/cm^3	gramas por centímetro cúbico
GPa	giga pascal
h	horas
HCl	ácido clorídrico
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H_3PO_4	ácido fosfórico
HBr	ácido nítrico
He-Ne	hélio-neon
HNO_3	ácido fórmico
kV	quilovolt
L	litro
$\log \text{UFC.g}^{-1}$	escala logarítmica de unidades formadoras de colônias por grama
m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
mA	miliampere
mg	miligrama

min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
mmol	milimol
mN/m	milinewton por metro
mol.L ⁻¹	mol por litro
MPa	mega pascal
mV	milivolt
N	normal
N [·]	expoente adimensional
Na ⁺	íon sódio
NaBr	brometo de sódio
NaClO	hipoclorito de sódio
NaClO ₂	clorito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
n _i	número de partículas
nm	Nanômetro
nW	Nanowatts
Pa	Pascal
Pd	Paládio
pH	potencial hidrogeniônico
r	Raio
R ² adj	ajuste do coeficiente de determinação
rpm	rotação por min
s	Segundos
Σ	Somatório
u.a	Adimensional
v/v	volume/volume
W.L ⁻¹	watts por litro
η	viscosidade aparente
η ₀	viscosidade aparente na taxa de cisalhamento zero
θ _{OA}	Ângulo de contato trifásico

ζ	potencial zeta
γ	tensão interfacial
$\gamma.$	taxa de cisalhamento

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO DA TESE.....	19
CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2.1 Objetivos.....	22
2.2 Referências.....	22
CAPÍTULO 3: REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3.1 Celulose bacteriana: estrutura e propriedades.....	26
3.2 Nanocelulose: fundamentos, conceitos e aplicações.....	32
3.2.1 <i>Celulose nanofibrilada</i>	37
3.2.2 <i>Nanocristais de celulose</i>	38
3.3 Propriedades das nanoceluloses e caracterização.....	40
3.4 Processos para obtenção de nanoceluloses bacteriana.....	47
3.4.1 <i>Separação e purificação da celulose bacteriana</i>	48
3.4.2 <i>Processos de obtenção de celulose nanofibrilada</i>	49
3.4.3 <i>Processos de obtenção de nanocristais de celulose</i>	55
3.5 Nanocelulose como estabilizadores de emulsões Pickering em alimentos.....	59
3.6 Mecanismo de adsorção interfacial e estabilização das emulsões Pickering.....	66
3.7 Referências.....	72
CAPÍTULO 4: NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA OU NANOFIBRILAS COMO ESTABILIZADORES DE PICKERING EM EMULSÕES DE BAIXO TEOR DE OLEO: UM ESTUDO COMPARATIVO.....	103
4.1 Introdução.....	104
4.2 Materiais e métodos.....	107
4.2.1 <i>Materiais</i>	107
4.2.2 <i>Preparação de nanofibrilas de CB oxidadas (CBNF)</i>	107
4.2.3 <i>Preparação de nanocristais de celulose bacteriana (NCCB)</i>	108
4.2.4 <i>Caracterização físico-química de nanoceluloses bacterianas</i>	108
4.2.4.1 <i>Medições de potencial zeta</i>	108
4.2.4.2 <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	109
4.2.4.3 <i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	109
4.2.4.4 <i>Ângulo de contato e tensão interfacial</i>	109
4.2.5 <i>Preparação de emulsões Pickering de óleo em água</i>	110
4.2.6 <i>Caracterização físico-químicas das emulsões Pickering</i>	110
4.2.6.1 <i>Tamanho das gotas – microscopia óptica</i>	110
4.2.6.2 <i>Estabilidade</i>	111
4.2.6.2.1 <i>Estabilidade à temperatura ambiente</i>	111
4.2.6.2.2 <i>Estabilidade acelerada</i>	111
4.2.6.3 <i>Cryo-SEM</i>	111
4.2.6.4 <i>Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)</i>	112
4.2.6.5 <i>Reologia</i>	112
4.2.7 <i>Análise estatística</i>	113
4.3 Resultados e Discussão.....	113
4.3.1 <i>Caracterização físico-química das nanoceluloses: nanofibrilas e nanocristais</i>	113
4.3.1.1 <i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	115
4.3.1.2 <i>Tensão interfacial na interface óleo-água</i>	117

4.4 Emulsões de Pickering.....	118
4.4.1 Caracterização físico-química.....	118
4.4.2 Estabilidade.....	122
4.4.3 Efeito da adição de NaCl.....	126
4.5 Reologia.....	128
4.6 Conclusão.....	131
4.7 Referências.....	131
CAPÍTULO 5: PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA.....	140
5.1 Introdução.....	141
5.2 Materiais e métodos.....	143
5.2.1 Materiais.....	143
5.2.2 Preparação das nanoceluloses bacteriana.....	143
5.2.2.1 Preparação da celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF-CMC).....	145
5.2.2.2 Preparação dos nanocristais de celulose (NCCB-NaOH).....	146
5.2.3 Preparação de pó das suspensões de nanoceluloses por pulverização (spray dryer).....	146
5.2.4 Caracterização das nanoceluloses.....	146
5.2.4.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	146
5.2.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	147
5.2.4.3 Medidas de potencial zeta.....	147
5.2.4.4 Difração de raio-X (DRX).....	147
5.2.4.5 Avaliação da dispersibilidade.....	148
5.2.5 Preparação das emulsões Pickering óleo em água.....	149
5.2.5.1 Preparação das emulsões Pickering.....	149
5.2.5.2 Estabilidade das emulsões Pickering.....	149
5.2.6 Citotoxicidade.....	150
5.3 Resultados e Discussão.....	151
5.3.1 Caracterização das nanoceluloses.....	151
5.3.1.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	151
5.3.1.2 Tamanho, morfologia e potencial zeta.....	153
5.3.1.2.1 Celulose bacteriana nanofibrilada (NFCB-CMC).....	153
5.3.1.2.2 Nanocristais de celulose bacteriana (NCCB-NaOH).....	159
5.3.1.3 Difração de raio-X (DRX).....	161
5.3.1.4 Avaliação da secagem e dispersibilidade.....	166
5.3.2 Formação e estabilidade das emulsões Pickering.....	170
5.3.3 Citotoxicidade.....	172
5.4 Conclusão.....	175
5.5 Referências.....	176
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	179
6.1 Conclusões.....	179
6.2 Perspectivas.....	180

CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese está organizada em seis capítulos centrais. No Capítulo 2 encontra-se a introdução geral para a apresentação do assunto, destacando a relevância da pesquisa, o problema específico que será abordado e como contribuirá para o conhecimento existente. Neste capítulo 2 encontram-se também os objetivos da pesquisa de tese. O Capítulo 3 consiste em uma revisão da literatura, em que serão expostos os aspectos necessários ao entendimento da pesquisa. Nos Capítulos 4 e 5 são apresentados o desenvolvimento e resultados da pesquisa. Cada capítulo compreende às seções de introdução, materiais e métodos, resultados e discussão e conclusão, seguido pela lista de referências bibliográficas utilizadas. O Capítulo 4 concentra-se em determinar os efeitos da força iônica e do tipo e concentração de nanocelulose na estabilidade de sistemas de emulsões com baixa fração de óleo. No Capítulo 5 é apresentado aprimoramentos para os processos de obtenção de nanofibrilas de celulose e nanocristais de celulose bacteriana, visando facilitar sua produção em escala industrial e otimizar a aplicação dessas nanoceluloses em emulsões Pickering. No capítulo 6 as conclusões gerais são apresentadas, seguido das perspectivas futuras no tema.

CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Na indústria alimentícia, emulsões de óleo em água são geralmente estabilizadas por emulsificantes de qualidade alimentar, como proteínas, fosfolipídios, surfactantes e polissacarídeos. Esses emulsificantes são adsorvidos na interface óleo-água, protegendo as gotículas de emulsão contra a agregação, principalmente através da redução da tensão interfacial (CAI et al., 2023; MCCLEMENTS, 2015).

Os emulsificantes mais utilizados na indústria alimentícia são surfactantes de molécula pequena, biopolímeros anfífilicos e matéria particulada ativa na interface (Jiang et al., 2020). Embora os emulsificantes convencionais (ou seja, surfactantes) tenham sido usados com sucesso, seu consumo tem recebido atenção da pesquisa nos últimos anos devido a evidências preliminares de efeitos adversos à saúde humana (CHASSAING ET AL., 2015; COX et al., 2021; JIANG et al., 2020; JIA et al., 2016; NAIMI et al., 2021; RIBER, 2021; VIENNOIS et al., 2020). Consequentemente, a ciência das emulsões tem impulsionado o desenvolvimento de novas abordagens para melhorar a qualidade e funcionalidade dos alimentos (BAI et al., 2021a).

Nesse contexto, foram desenvolvidos novos tipos de emulsões, como as emulsões Pickering, que são livres de surfactantes, emulsões altamente estáveis revestidas por uma camada de partículas sólidas na interface óleo-água (BAI et al., 2021a), apresentando afinidade por ambas as fases (anfifilicidade) que resulta em propriedades adequadas de molhabilidade. Emulsões Pickering geralmente têm uma resistência forte à coalescência devido à ligação quase irreversível de partículas coloidais à superfície das gotículas, substituindo os surfactantes (MING et al., 2023; MORAIS et al., 2023).

Dentre as macromoléculas naturais, os recursos celulósicos têm atraído ampla atenção devido às suas características tecnologicamente funcionais, econômicas, renováveis e não tóxicas. Atendem a requisição básica como estabilizadores de partículas permanecendo insolúveis e intactos em ambas as fases durante a vida útil do sistema de emulsão Pickering, portanto funcionam como emulsionantes eficientes de Pickering e aceitáveis para uso em produtos alimentícios em escala comercial (LI et al., 2021).

A nanocelulose é um material versátil com propriedades multifuncionais para uma ampla gama de aplicações na ciência de alimentos, não somente devido às suas características naturais e verdes, mas também facilmente acessíveis às modificações físicas ou químicas (ANGKURATIPAKORN et al., 2017; DUPONT et al., 2020; PAXIMADA et al., 2020;

AMORIM et al., 2020). A nanocelulose pode exibir grande área superficial e proporção de aspecto, sendo a cristalinidade, propriedades mecânicas, estabilidade térmica e funcionalidade química da nanocelulose diferentes daquelas dos materiais a granel (PENG et al., 2020; XIAO et al., 2016).

Os vários tipos de nanoceluloses, incluindo os nanocristais e nanofibrilas de origem vegetal e bacteriana foram aplicados com sucesso para formar emulsões Pickering estáveis e numerosas pesquisas têm se concentrado na fabricação de sistemas de emulsão Pickering de qualidade alimentar estabilizados por nanoceluloses (HUANG et al., 2024; KALASHNIKOVA et al., 2011; Z. LIU et al., 2021; PAXIMADA et al., 2016; SOMMER; STAROSZCZYK, 2023; WANG et al., 2023; WU et al., 2023; YAN et al., 2017; K. ZHANG et al., 2024; S. ZHANG et al., 2023). Esses sistemas de emulsões Pickering baseados em nanocelulose estão atualmente ganhando uma demanda crescente nos campos de tecnologia de impressão tridimensional (JI; WANG, 2023), sistemas de entrega direcionados (BAI et al., 2021b) e materiais de embalagem de alimentos (WONG et al., 2023), o que é extremamente importante para aplicações práticas em produtos de qualidade alimentar.

No entanto, a viabilidade do uso das nanoceluloses em produtos alimentícios em escala comercial é precedida da fabricação de nanocelulose como matéria-prima. Assim, o estudo dos tipos de processos para a produção de nanoceluloses em larga escala pode contribuir para viabilizar os benefícios oriundos da sua aplicação. Definir sistemas com o menor consumo de recursos naturais e a redução da quantidade de resíduos gerados, sem alterar suas propriedades físicas e químicas está entre os principais objetivos no desenvolvimento de uma cadeia de suprimento sustentável.

Portanto, o presente trabalho visou desenvolver um estudo sistemático do processamento e caracterização de nanoceluloses bacteriana, nomeadamente nanocristais e nanofibrilas, com o objetivo de compreender e validar sistemas verdes e escalonáveis de emulsões Pickering voltados para a indústria de alimentos. Para isso, nanoceluloses em suspensão ou em pó foram avaliadas quanto às suas características morfológicas, funcionalização, molhabilidade, tensão interfacial, cristalinidade e citotoxicidade. A aplicação das nanoceluloses em sistemas de emulsões Pickering foi realizada usando os métodos de emulsificação por alto cisalhamento, ultrassom e microfluidizador de alta pressão e seus desempenhos avaliados quanto às características físico-químicas, morfológicas e reológicas, e sua estabilidade em função do tempo de armazenamento.

2.1 Objetivos

O trabalho apresentado nesta tese visa contribuir para o conhecimento e a ampliação da aplicação da celulose bacteriana. No âmbito do projeto são propostos processos e aplicações de nanocelulose bacteriana como estabilizadores de emulsões Pickering com foco em alimentos. Os principais objetivos deste trabalho são:

- Avaliar o desempenho de nanofibrilas oxidadas pelo catalizador TEMPO e nanocristais obtidas por hidrólise com ácido sulfúrico em emulsões Pickering com baixa fração de óleo (1%);
- Caracterizar as nanoceluloses obtidas e avaliar o efeito das suas propriedades como estabilizadores das emulsões com baixa fração de óleo;
- Aprimorar os processos de obtenção de nanofibrilas e nanocristais visando facilitar sua aplicação industrial;
- Avaliar a capacidade de secagem das nanoceluloses, redispersão, e suas características no efeito das suas propriedades como estabilizadores de emulsões Pickering óleo em água.

2.2 Referências

AMORIM, J. D. P. *et al.* Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p. 851-869, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00989-9>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ANGKURATIPALORN, T. *et al.* Fabrication and characterization of rice bran oil-in-water Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 522, p. 310-319, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.03.014>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BAI, L. *et al.* Recent Advances in Food Emulsions and Engineering Foodstuffs Using Plant-Based Nanocelluloses. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 12, p. 383-406, 2021a. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-food-061920-123242>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BAI, L. *et al.* Recent Innovations in Emulsion Science and Technology for Food Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, issue 32, p. 8944-8963, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01877>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CAI, Z. *et al.* Correlation between interfacial layer properties and physical stability of food

emulsions: current trends, challenges, strategies, and further perspectives. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 313, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102863>. Acesso em: 30 nov. 2024.

CHASSAING, B. *et al.* Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, p. 92–96, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14232>. Acesso em: 23 jan. 2024.

COX, S. *et al.* Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. **Nutrition Reviews**, v. 79, issue 6, p. 726–741, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa038>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DUPONT, H. *et al.* New Insights into the Formulation and Polymerization of Pickering Emulsions Stabilized by Natural Organic Particles. **Macromolecules**, v. 54, p. 4945–4970, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.1c00225>. Acesso em: 23 jan. 2024.

Jl, C.; WANG, Y. Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions: Fabrication, stabilization, and food applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 318, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102970>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JIA, Y. *et al.* Surfactant-free emulsions stabilized by tempo-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 907–915, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.099>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JIANG, Y. *et al.* Effects of sodium alginate on microstructural and properties of bacterial cellulose nanocrystal stabilized emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 607, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125474>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KALASHNIKOVA, I. *et al.* New Pickering Emulsions Stabilized by Bacterial Cellulose Nanocrystals. **Langmuir**, v. 27, issue 12, p. 7471–7449, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la200971f>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KAUR, P. *et al.* Nanocellulose: Resources, Physio-Chemical Properties, Current Uses and Future Applications. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.747329>. Acesso em: 22 jan. 2024.

LI, Q. *et al.* Application of Nanocellulose as particle stabilizer in food Pickering emulsion: Scope, Merits and challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 573–583, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.027>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LIU, Z. *et al.* Bacterial cellulose nanofibers improved the emulsifying capacity of soy protein isolate as a stabilizer for Pickering high internal-phase emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 112, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106279>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MCCLEMENTS, D. Reduced-Fat Foods: The Complex Science of Developing Diet-Based Strategies for Tackling Overweight and Obesity. **Advances in Nutrition**, v. 6, issue 3, p. 3385–3585, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/an.114.006999>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MING, L. *et al.* Evolution and critical roles of particle properties in Pickering emulsion: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 388, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122775>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MORAIS, J. P. S. *et al.* Sustainable Pickering Emulsions with Nanocellulose: Innovations and Challenges. **Foods**, v. 12, issue 19, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12193599>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NAIMI, S. *et al.* Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. **Microbiome**, v. 9, n. 66, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00996-6>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PAXIMADA, P. *et al.* Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 225-232, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.003>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PAXIMADA, P.; KANAVOU, E.; MANDALA, I. G. Effect of rheological and structural properties of bacterial cellulose fibrils and whey protein biocomposites on electrosprayed food-grade particles. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116319>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PENG, B. *et al.* Cellulose-based materials in wastewater treatment of petroleum industry. **Green Energy & Environment**, v. 5, issue 1, p. 37-49, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.09.003>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SOMMER, A.; STAROSZCZYK, H. Bacterial cellulose vs. bacterial cellulose nanocrystals as stabilizer agents for O/W Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 145, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109080>. Acesso em: 30 nov. 2023.

VIENNOIS, E. *et al.* Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive E. coli Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. **Cell Reports**, v. 33, issue 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108229>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WANG, Y. *et al.* Recent advances in sustainable preparation of cellulose nanocrystals via solid acid hydrolysis: A mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 7, 2023a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127353>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WONG, S. K. *et al.* Transforming the Chemical Functionality of Nanocellulose for Applications in Food Pickering Emulsions: a Critical Review. **Food Reviews International**, v. 40, issue 4, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2212034>. Acesso em: 22 nov. 2024.

WU, Y. *et al.* Effect of surface charge density of bacterial cellulose nanofibrils on the properties of O/W Pickering emulsions co-stabilized with gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 138, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108447>. Acesso em: 22 jan. 2024.

YAN, H. *et al.* Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil Pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p.

127-135, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHANG, K. *et al.* Modulating *in vitro* gastrointestinal digestion of nanocellulose-stabilized Pickering emulsions by altering particle surface charge. **Food Chemistry**, v. 434, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137521>. Acesso em: 30 nov. 2024.

ZHANG, S. *et al.* Gastrointestinal fate and fatty acid release of Pickering emulsions stabilized by mixtures of plant protein microgels + cellulose particles: an *in vitro* static digestion study. **Food Biophysics**, v. 18, p. 120–132, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11483-022-09756-5>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHENG, Y. *et al.* Extraction and preparation of cellulose nanocrystal from Brewer's spent grain and application in Pickering emulsions. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 31, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2024.100418>. Acesso em: 30 nov. 2024.

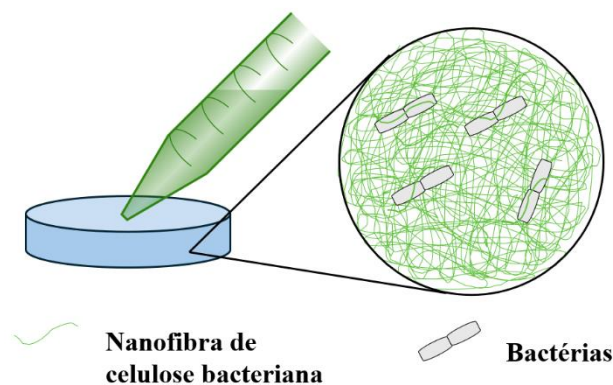
CAPÍTULO 3: REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Celulose bacteriana: estrutura e propriedades

A celulose bacteriana, também chamada de nanocelulose bacteriana, celulose microbiana ou biocelulose, é um metabólito secundário sintetizado por diferentes bactérias, a partir da fermentação oxidativa de meios de cultura ricos em sacarídeos. Como parte do metabolismo da glicose, a bactéria produz cadeias de celulose que são secretadas no meio por extrusão através de poros localizados na membrana celular. A união dessas fibrilas forma uma película que retém as bactérias formando um biofilme sobre o substrato em decomposição (Figura 3.1) (MUIRURI et al., 2023; HUANG et al., 2013).

A celulose é um componente importante dos biofilmes bacterianos, que aumentam a tolerância das células para uma série de estresses bióticos e abióticos e aumentam a adesão à superfície, a cooperação celular e a captura de recursos. Os biofilmes contendo celulose também demonstraram estar envolvidos na patogenicidade, permitindo que as bactérias resistam aos antibióticos e à desinfecção (NICOLAS et al., 2021).

Figura 3.1 – Rede de nanofibrilas de celulose produzidas por fermentação de bactérias

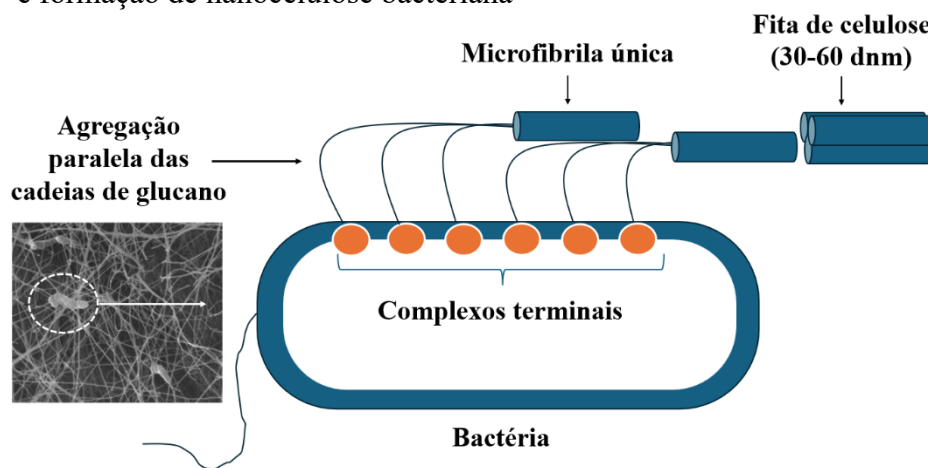


Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Miyashiro et al., 2020.

Os poros localizados na membrana celular das bactérias são chamados de complexos terminais lineares (CT) (GU; SOMERVILLE, 2010; GAMA et al., 2017). Cada CT contém várias subunidades com múltiplos locais catalíticos, onde as cadeias de celulose são polimerizadas, agregadas e cristalizadas. Cada subunidade de CT secreta múltiplas cadeias que

se ligam entre si, formando folhas ordenadas por forças de van der Waals. Essas folhas se agrupam em fibrilas elementares dentro do CT através de ligações de hidrogênio entre as cadeias. Várias fibrilas elementares se agregam em microfibrilas, que podem se organizar em estruturas de fibras mais complexas (MARTINS, 2021). A Figura 3.2 ilustra a formação de celulose bacteriana, mostrando como as fibrilas elementares são organizadas após serem secretadas através do CT.

Figura 3.2 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de *Acetobacter xylinus* e formação de nanocelulose bacteriana



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptada de Shi et al., 2014 e Wang et al., 2017.

Diferentes organismos ou espécies sintetizadoras de celulose apresentam configurações distintas de CT, resultando em arquiteturas variadas de fibrilas, apesar da semelhança química das cadeias. Essas variações impactam a morfologia final do material (MARTINS, 2021; NICOLAS et al., 2021).

As bactérias do gênero *Komagataeibacter*, anteriormente designada *Gluconacetobacter*, são consideradas organismos modelos para o estudo da biosíntese de celuloses bacteriana e como cepas industriais para a fermentação comercial, pois possui a capacidade de assimilar vários açúcares e produzir altos níveis de celulose em meio líquido (CHUNYAN ZHONG, 2020; RYNGAJOO et al., 2020; YAMADA et al., 2014). *Komagataeibacter* pertencem ao grupo de bactérias ácido acético (BAA); são bactérias gram-negativas estritamente aeróbicas classificadas em α -Proteobactérias. A espécie *Komagataeibacter xylinus* é a mais amplamente utilizada para a produção de celulose bacteriana. Um aspecto importante do uso da BAA para a produção de celulose é a sua

característica de serem bactérias de grau alimentício ou GRAS (geralmente reconhecidas como seguras) (GORGIEVA et al, 2019).

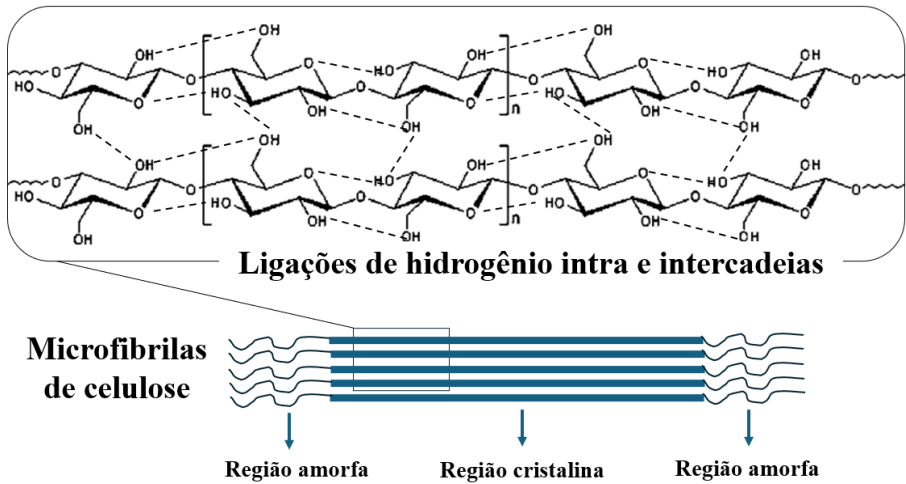
A celulose bacteriana é um polissacarídeo que produz naturalmente, redes tridimensionais de nanofibrilas porosas com diâmetros de aproximadamente 30–60 nm, e por isso, também é conhecida como nanocelulose bacteriana. Suas fibras são mais finas que a celulose de origem vegetal (cerca de 100 vezes). Além disso é a forma mais pura de celulose, sem a presença de hemicelulose, lignina ou pectina (REINIATI et al., 2016; MISHRA et al., 2022; MANAN et al., 2022; WANG et al., 2017).

Estruturalmente, a celulose em sua forma mais simples, consiste em cadeias de glucano ligadas por ligações β -1,4. As Ligações de hidrogênio se formam entre grupos hidroxila e átomos de oxigênio tanto dentro de uma única cadeia de glicose (ligações intracadeias) quanto entre cadeias vizinhas (ligações intercadeias). As ligações intracadeias estabilizam a configuração linear de uma cadeia de glicose, enquanto as ligações intercadeias ajudam a formar agregados organizados de várias cadeias de celulose. Juntamente com as forças de van der Waals, as ligações de hidrogênio agregam firmemente as cadeias de glucano lado a lado, promovendo uma ordenação paralela de microfibrilas de celulose (LI et al., 2014).

As microfibrilas altamente ordenadas constituem a celulose cristalina, que alterna com regiões desordenadas durante a sua formação, conhecidas como celulosas amorfas. A celulose amorfa resulta de regiões onde ligações de hidrogênio são quebradas e o arranjo ordenado é perdido. Na celulose cristalina, as moléculas de glicose ao longo das cadeias são giradas em $\sim 180^\circ$ em torno das ligações β -1,4, formando a menor unidade de repetição da celulose, a celobiose (CASTANEDA et al., 2013; COCINERO et al., 2009). A Figura 3.3 ilustra a estrutura de cadeias da celulose, mostrando como as unidades de glicose se conectam, a disposição das ligações de hidrogênio que conferem estabilidade à estrutura da região cristalina e a unidade repetidora de celobiose.

Cada monômero de glicose possui três grupos hidroxila (-OH). Esses grupos são muito reativos e capazes de formar ligações de hidrogênio com moléculas de água, sendo responsáveis pela ligação de moléculas de água dentro da estrutura da celulose bacteriana. Além do teor de celulose (2% em massa) e quantidades mínimas de proteínas e ácidos nucleicos, o maior conteúdo presente (98% em massa) na celulose bacteriana é a água (PORTELA et al., 2019).

Figura 3.3 – Estrutura da celulose com destaque da unidade repetidora de celobiose entre colchetes.



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptada de Nascimento, 2017.

O número total de unidades de glicose nas cadeias de celulose é chamado grau de polimerização. O grau de polimerização varia conforme a fonte da celulose e pode ser estimado por diferentes métodos, como a média numérica, a média ponderal e a média de viscosidade. A Tabela 3.1 apresenta o grau de polimerização de diferentes fontes de celulose.

Tabela 3.1 – Grau de polimerização da celulose de várias fontes

Fonte	Grau de polimerização (intervalo)
Madeira	250-10000
Planta	1000-15000
Bacteria	7000-16000
Alga	2500-4300
Tunicado	700-3500

Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Seddiqi et al., 2021.

Na celulose bacteriana, o grau de polimerização também pode variar, dependendo de fatores como gêneros/cepas bacterianas, condições de fermentação e fontes de nutrientes (ZHONG, 2020). Os valores de grau de polimerização na celulose bacteriana encontram-se na faixa de 7.000 a 16.000 (SEDDIQI et al., 2021), o que corresponde a massas molares de

1.134.000 a 2.592.000 g/mol (D'ALMEIDA, 1988). Este parâmetro desempenha um papel importante nas propriedades físico-químicas do material celulósico (AZEVEDO, 2011). Por exemplo, a massa molecular é um dos fatores que afetam a solubilidade da celulose e, consequentemente, determina sua aplicabilidade (ARMIR et al., 2021).

A estrutura da celulose bacteriana é essencialmente cristalina. O arranjo espacial da agregação pré-microfibrilar fornece uma alta cristalinidade, de até 84–89%, enquanto os valores para celulose vegetal variam de 40 a 60%. Isso resulta em um módulo de Young típico na faixa de 15–35 GPa, com a resistência à tração na faixa de 200–300 MPa. O módulo relativamente alto faz com que a celulose bacteriana atue como elementos de reforço em matriz polimérica (HUANG et al., 2014).

A celulose pode existir em diferentes formas cristalinas, conhecidas como polimorfos, que incluem principalmente a celulose I e a celulose II. Cada uma dessas formas possui uma organização distinta das cadeias de glucano e, portanto, um número diferente de ligações de hidrogênio entre elas. A forma cristalina natural da celulose é a celulose I, onde as cadeias de glucano estão organizadas de forma paralela (sem ligações de hidrogênio entre as folhas) e fortes ligações covalentes se estendem em uma direção longitudinal e reticuladas por ligações de hidrogênio. Na celulose II, as cadeias são antiparalelas (com ligações de hidrogênio entre as folhas) (FARIA-TISCHER et al., 2015).

A diferença na organização das celulosas I e II resulta em variações no padrão e na densidade das ligações de hidrogênio, o que influencia diretamente a estabilidade e a resistência do material (THOMAS et al., 2008). A quantidade e a força dessas ligações de hidrogênio determinam a rigidez e a resistência da estrutura da celulose à degradação. Quanto mais ligações de hidrogênio houver, mais difícil será quebrar a estrutura cristalina da celulose, aumentando sua resistência à decomposição e conversão por processos químicos ou biológicos. Portanto, a forma cristalina da celulose afeta sua recalcitrância geral (JALAK, 2017; YOUNESI et al., 2019; IVANOVA et al., 2020).

A celulose natural ou celulose I, possui ligações de hidrogênio mais organizadas e estáveis e geralmente, é mais resistente à degradação biológica do que a celulose II, o que é relevante para aplicações que exigem durabilidade contra enzimas ou microrganismos. No corpo humano, não há enzimas capazes de catalisar a degradação da celulose (IVANOVA et al., 2020). Dessa forma, a celulose I é utilizada em biotecnologia e medicina como curativos para feridas e em suportes para engenharia de tecidos, devido à sua alta pureza e resistência mecânica

(ABOELNAGA et al., 2018; RAJWADE et al., ; ANTON-SALES et al., 2019; PORTELA et al., 2019).

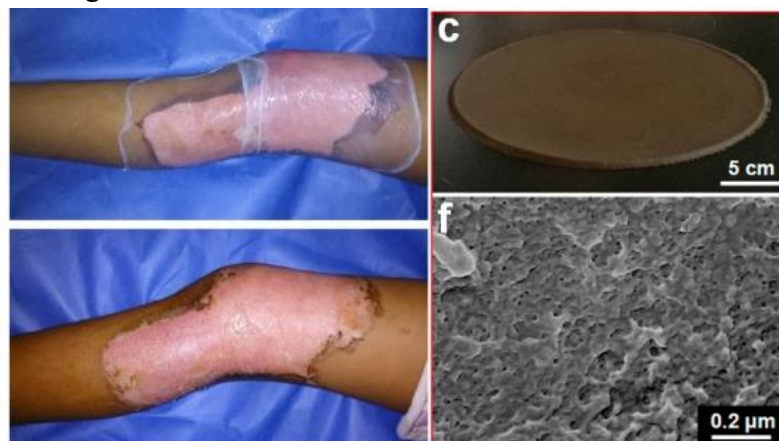
A celulose II é termodinamicamente mais estável e pode ser obtida a partir da celulose I por duas rotas distintas: mercerização (tratamento irreversível com álcali) e regeneração (solubilização e posterior recristalização) (CASTANEDA et al., 2013).

A mercerização é um processo químico que envolve o tratamento da celulose com uma solução alcalina concentrada (geralmente NaOH 17-20%) (KARIMI et al., 2016; UPPAL et al., 2022). Esse tratamento altera a estrutura da celulose I, tendendo a enfraquecer as ligações de hidrogênio intermoleculares e diminuir a cristalinidade da celulose, resultando em uma estrutura de celulose II mais amorfa e reativa (NAGARAJAN et al., 2017). Essas mudanças produzem propriedades importantes com aplicação na indústria têxtil e de papel que incluem aumento da resistência, melhora da absorção de corantes, redução do encolhimento e aumento do brilho (BULKCOTTON, 2024; THOMAS, 1967). Estas aplicações são comuns para celulose de plantas. Na celulose bacteriana, a mercerização pode ser usada para modificar a estrutura e ajustar as propriedades mecânicas para aplicações biomédicas, desde propriedades rígidas como osso até propriedades semelhantes a tendões (YOUNESI et al., 2019).

A regeneração da celulose I compreende a dissolução da celulose em um solvente, como o N-methylmorpholine N-oxide (NMMO), e subsequente precipitação para formar a celulose II (BAGHERJERI et al., 2024). Esse processo altera a conformação da cadeia de celulose, resultando em uma estrutura com mais regiões amorfas, porém com ligações de hidrogênio intermoleculares mais fortes e cristalinidade aprimorada. Isso permite modificações extensivas nos produtos de celulose regenerada, como hidrogel, aerogel, criogel, xerogel, fibras, membranas e filmes finos (ARMIR et al., 2021).

Outras formas cristalinas menos comuns de celulose são as celuloses III e IV, ambas as formas podem ser obtidas por tratamentos químicos para modificações estruturais da cadeia de celulose e são derivadas da celulose I ou celulose II (SEDDIQI et al., 2021). A Figura 3.4 mostra as aplicações da celulose bacteriana nas formas cristalinas celulose I e celulose II.

Figura 3.4 – Aplicações da celulose bacteriana: (a) celulose I - curativos para feridas; (b) e celulose II – filme de celulose regenerada antibacteriano para embalagens de alimentos



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptada de Aboelnaga et al., 2018; Gu et al., 2019.

Além das propriedades e aplicações das formas convencionais da celulose bacteriana (celuloses I e II), destacam-se as nanoceluloses obtidas em forma de cristais ou fibrilas, nomeadamente nanocristais de celulose ou celulose nanofibrilada respectivamente (DUFRESNE, 2017; NASCIMENTO et al., 2015). A utilização dessas nanoestruturas de celulose oferece vantagens significativas, devido as propriedades únicas que inclui alta resistência mecânica, maior área de superfície específica, transparência óptica, biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de modificar sua química de superfície (CHUNYAN, 2019; TRACHE et al., 2020). Portanto, diferentes processos de obtenção de nanoceluloses, considerando a origem e aplicações, têm sido estudados para o avanço de diferentes setores industriais (HEDJAZI et al., 2018).

3.2 Nanocelulose: fundamentos, conceitos e aplicações

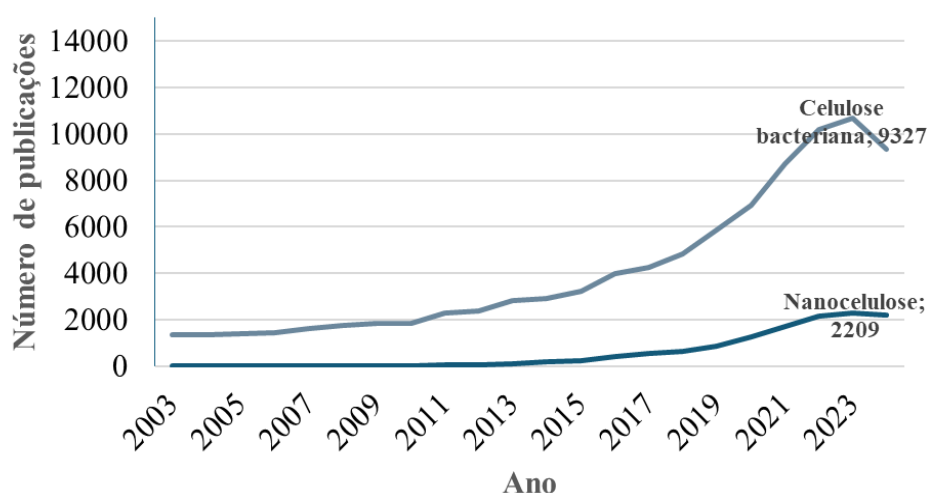
Os materiais à base de celulose e seu potencial para diferentes aplicações têm sido objeto de estudo por mais de um século (CAROLIN et al., 2023). Anselme Payen, um cientista francês, extraiu celulose de plantas pela primeira vez em 1837 (PENG et al., 2020). No entanto, somente na metade do século XX foi possível extrair e caracterizar adequadamente celulose em escala nanométrica, que hoje conhecemos como nanoceluloses.

Nanocelulose foi produzida, intencionalmente, em 1949 e 1951 por Rånby et al., referindo-a como micelas de celulose. Rånby utilizou hidrólise ácida com ácido sulfúrico

diluído para produzir nanocristais de celulose (NCCs) de madeira e algodão e obteve as primeiras imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) dessas estruturas. Apesar da descoberta inicial, a nanocelulose permaneceu pouco estudada por várias décadas (BORDES et al., 2017; GIRARD et al., 2024). A descrição do método para obter uma suspensão de celulose nanofibrilada por Turbak et al. e Herrick et al. ocorreu apenas em 1983. A propriedade líquido-cristalina de nanocristais de celulose dispersos em água foi estudada pela primeira vez por Marchessault et al. em 1959, porém o mecanismo de formação da fase líquido-cristalina quiral nemática em filmes nanocristais de celulose foi apenas relatado em 1992. Anos depois, em 1995, Favier et al. relataram a primeira tentativa de reforçar um polímero com nanocristais de celulose. Desde então, os materiais de nanocelulose foram misturados ou dispersos em uma variedade de matrizes poliméricas e usados para diferentes aplicações (NASCIMENTO et al., 2018).

Nos últimos vinte anos, o interesse na pesquisa de nanoceluloses, especialmente a bacteriana, levou a um número elevado de publicações, patentes e simpósios (BORDES et al., 2017). O número de publicações sobre nanoceluloses a cada ano, é mostrado na Figura 3.5, de acordo com informações coletadas do banco de dados de pesquisas científicas Science Direct.

Figura 3.5 – Produção científica sobre nanocelulose de plantas e celulose bacteriana (2003-2024)



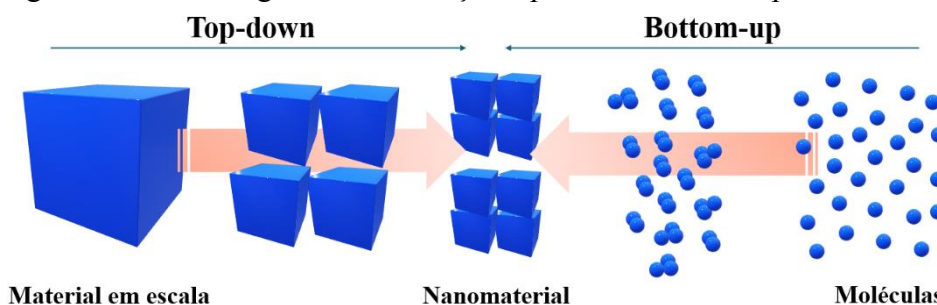
*Os dados para o número de publicações em 2024 são até 5 de julho.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os principais grupos de nanoceluloses estudados incluem os nanocristais de celulose, celulose nanofibrilada, celulose bacteriana e, mais recentemente, nanocristais de celulose pilosa (DUFRESNE, 2014; DUFRESNE et al., 2019), e a diferença é essencialmente

em suas geometrias. Cada geometria possui uma ou mais dimensões externas na faixa de tamanho 1–100 nm para 50% ou mais das partículas na distribuição do tamanho numérico, definindo-as como um nanometrial (2011/696/EU) (AFKHAMI, A.; MADRAKIAN, T.; AHMADI, M., 2023).

A construção dos diferentes grupos de nanoceluloses envolve abordagens teórico-experimentais chamadas de *top-down* (construção de cima para baixo) e *bottom-up* (construção de baixo para cima). O método *top-down* envolve a redução de materiais de maior escala para estruturas nano através de técnicas físicas ou químicas, enquanto o método *bottom-up* usa moléculas ou átomos individuais para construir blocos em escala nano. A Figura 3.6 mostra uma representação das abordagens de *top-down* e *bottom-up* na construção de nanomateriais.

Figura 3.6 – Abordagens de construção *top-down* e *bottom-up* de nanomateriais



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Lu et al., 2020.

A celulose bacteriana é um nanomaterial construído naturalmente através da biossíntese bacteriana, utilizando o método de construção molecular *bottom-up*. Consiste na construção e crescimento das cadeias de glucose por meio da automontagem, para formar membranas compostas por redes de nanofibrilas de celulose agregadas (NASCIMENTO et al., 2018).

A técnica *bottom-up* pode ser usada para combinar celulose bacteriana a outro biopolímero ou material *in situ* ou *ex situ*. Na técnica *in situ*, nanofibrilas de celulose bacteriana podem crescer quando um segundo componente é adicionado ao meio de cultura, resultando na formação de diferentes nanocompósitos automontados. As propriedades do material introduzido podem influenciar e modificar a estrutura da celulose bacteriana, alterando seu padrão estrutural (AZEREDO et al., 2019). Xiloglucano, xilano e carboximetilcelulose (CMC) foram relatados para diminuir a cristalinidade da celulose bacteriana e estimular a sua produção (ZHOU et al., 2007; GU E CATCHMARK, 2012; CHENG et al., 2009). Poli-3-hidroxibutirato

(PHB) foi incorporado entre as fibrilas de celulose, indicando que a combinação *in situ* pode representar um mecanismo para polímeros insolúveis, e pode fornecer à celulose bacteriana melhorias em modificações feitas diretamente no meio de cultivo (RUKA et al., 2013). A presença de pectina, gelatina ou CMC no meio de cultura melhorou as propriedades mecânicas em comparação a celulose bacteriana pura. Isso foi atribuído à ligação desses polissacarídeos à celulose bacteriana, alterando a estrutura da rede de celulose e a capacidade de ligação de água (DAYAL E CATCHMARK, 2016).

Na técnica *ex situ*, a nanocelulose bacteriana produzida pelo método *bottom-up* pode ser isolada e modificada quimicamente, usando reagentes para alterar sua composição química, ou fisicamente geralmente através da absorção física. Neste caso, a matriz porosa da celulose bacteriana pode ser preenchida com soluções ou suspensões de partículas. Nanocompósito de celulose bacteriana e fibroína de seda foi preparado usando um método de modificação física *ex situ*. A proporção igual de celulose e fibroína em *scaffolds* demonstrou melhorar a permissividade celular em comparação com celulose bacteriana pura, preservando as propriedades individuais de ambos os materiais (BARUD et al., 2015). De maneira semelhante a absorção de polietilenoglicol 400 em esponja de celulose bacteriana foi investigada, resultando em uma esponja com alta área de superfície, alta porosidade e excelente biocompatibilidade (GAO et al., 2010). Modificação química *ex situ* foi aplicada como um método fácil para incorporação de nanopartículas de zinco em celulose bacteriana. Pileos de celulose bacteriana foi imergida em solução de nitrato de zinco, seguido pelo tratamento com solução NaOH, produzindo nanocompósito com propriedades antibacterianas e atividade fotocatalítica (WAHID et al., 2019).

Outros materiais comumente adicionados *in situ* ou *ex situ* com capacidade de melhorar as propriedades funcionais da celulose bacteriana produzidas via *bottom-up* incluem aloe vera, polímeros condutores, óxido de grafeno, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono de paredes múltiplas, alginato de sódio, hidroxiapatita, nisina, bromelina, ϵ -polylysine e cepas probióticas (SAIBUATONG et al., 2009; MÜLLER et al., 2012; ZHU et al., 2015; ARIAS et al., 2016; YAN et al., 2008; JIANG et al., 2020; LUO et al., 2014; SANTOS et al., 2018; ZHU et al., 2010, JANČIČ et al., 2024).

Além da abordagem *bottom-up* para a produção de celulose bacteriana e nanocompósitos de celulose bacteriana, as membranas produzidas naturalmente podem ser desconstruídas utilizando abordagem *top-down*, para produzir nanofibrilas (NFCs) e nanocristais

(NCCs) isolados (POTOČNIK et al., 2023). As nanoestruturas de celulose isoladas são mais fáceis de combinar em formulações, e as proporções de componentes podem ser controladas com mais precisão para as diferentes aplicações (AZEREDO et al., 2019). Possuem uma maior área de interação superficial (área de superfície) e podem alcançar maior dispersão em uma matriz, promovendo maior efeito de reforço mecânico ou proteção (YANG et al., 2023). Podem ainda ser aplicadas como agente espessante, modificador reológico ou para estabilizar emulsões (CHAVAN et al., 2023).

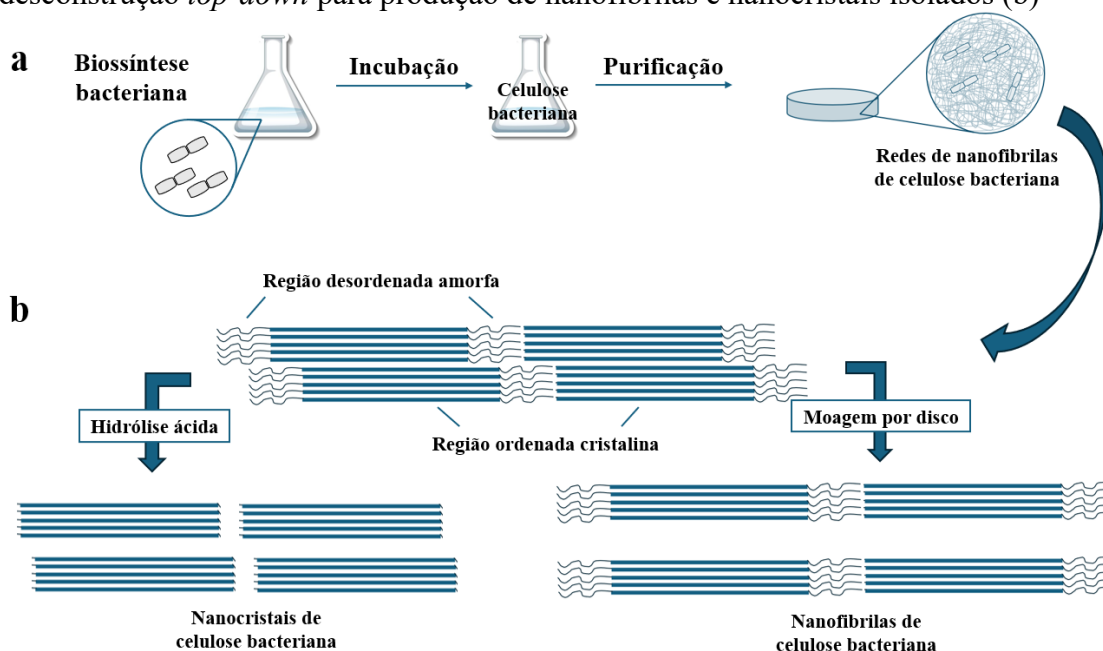
Nanofibrila de celulose bacteriana obtida por oxidação mediada por 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil (TEMPO) em uma mistura de biopolímero com goma de cajueiro, foi usada como matriz transportadora de probióticos em filmes comestíveis. As nanofibrilas apresentaram efeito protetor durante estabilidade de armazenamento, com contagens celulares viáveis superiores a $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ por pelo menos 45 dias (OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020). Em uma aplicação semelhante, filmes *all-bacterial cellulose* foram produzidos utilizando nanofibrilas obtidas por oxidação TEMPO como matriz e nanocristais como reforço, que resultou em filmes com notável resistência à tração, módulo de elasticidade e resistência à desintegração em água (NASCIMENTO et al., 2021). Celulose bacteriana desintegrada com um liquidificador de alto cisalhamento foi usada como espessante e comparada à goma xantana e goma de alfarroba. Uma menor concentração de celulose bacteriana (0,1%, em contraste com 0,7% goma xantana e 1% goma de alfarroba) foi necessária para obter a mesma viscosidade de cisalhamento (estresse de escoamento), indicando que a celulose bacteriana pode ser considerada uma alternativa de espessante alimentar de menor custo (PAXIMADA et al., 2016).

Nanocristais de celulose obtidos com 30% de ácido (hidrólise com ácido sulfúrico) apresentaram maior estabilidade de emulsão óleo em água quando comparado à sistemas de emulsão estabilizados com a celulose bacteriana natural homogeneizada. A maior estabilidade da emulsão com os nanocristais da celulose bacteriana observada resultou da densidade de carga superficial adquirida durante desconstrução por hidrólise ácida (SOMMER et al., 2023). A montagem interfacial de nanocristais preparados por hidrólise do ácido sulfúrico da celulose bacteriana biossintetizado também foi avaliada para melhorar a compatibilidade entre alginato e o fármaco alfacalcidol dissolvido na fase oleosa. A montagem interfacial dos nanocristais de celulose bacteriana proposto melhorou a carga e a liberação sustentada de alfacalcidol, preservando as gotículas em solução de alginato (YAN et al., 2019).

Nanofibrilas e nanocristais de celulose bacteriana são relatadas também, em

aplicações como aditivo alimentar de baixa caloria, hidrogel, aerogel, suporte para catálise e imobilização de enzimas, *scaffolds* para engenharia de tecidos, veículo para sistema de liberação controlada, biossensor e excipiente farmacêutico (PARK et al., 2021; VELÁSQUEZ-COCK et al., 2019; BIRDSONG et al., 2024; KIM et al., 2015; LI et al., 2021; YANG et al., 2023; TORRES et al., 2020; PANDEY, 2021). A Figura 3.7 mostra uma representação da biossíntese natural da celulose bacteriana *bottom-up* (a) e a sua desconstrução *top-down* (b) para produção de nanofibrilas e nanocristais isolados.

Figura 3.7 – Biossíntese natural da rede de nanocelulose bacteriana *bottom-up* (a) e a sua desconstrução *top-down* para produção de nanofibrilas e nanocristais isolados (b)



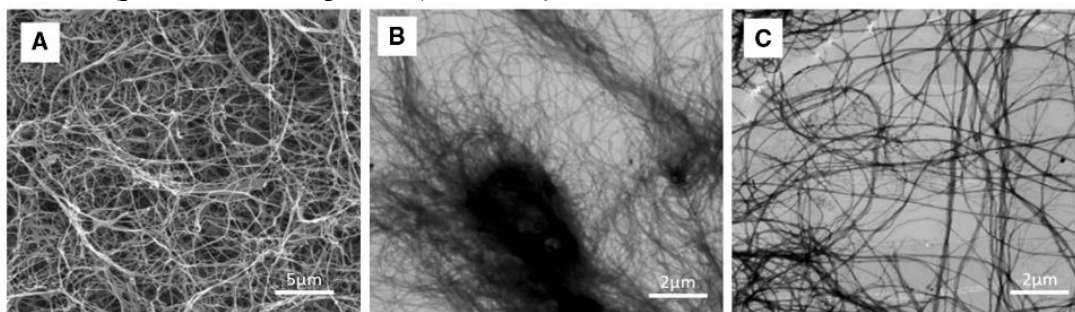
Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Carvalho et al., 2024.

3.2.1 Celulose nanofibrilada

A celulose nanofibrilada, também conhecida como nanofibrilas de celulose, microfibrila de celulose, celulose microfibrilada ou celulose nanofibrilar, é isolada através da desconstrução física das fibras de celulose ao longo do eixo longitudinal (PHANTHONG et al., 2018). A desconstrução das fibras ocorre geralmente por métodos mecânicos, como homogeneização de alta pressão, moagem ou trituração (ANDRADE et al., 2019; MENEGUIN et al., 2020), que são frequentemente combinados com pré-tratamentos químicos (NASCIMENTO et al., 2019) ou enzimáticos (KASHCHEYEVA et al., 2019), resultando em

dispersões de fibrilas com uma alta proporção de aspecto (relação comprimento/diâmetro). Caracterizam-se por comprimentos (C) na escala micrométrica e diâmetros (D) na escala de cinco a centenas de nanômetros, que variam com base na fonte das fibras de celulose e o tipo de tratamento (POULOSE et al., 2022). A Figura 3.8 compara a morfologia de nanofibrilas de celulose bacteriana antes e após diferentes tipos de tratamentos.

Figura 3.8 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de celulose bacteriana antes e após diferentes tipos de tratamentos: (A) nanocelulose bacteriana natural (B) celulose bacteriana nanofibrilada por trituração (C) celulose bacteriana nanofibrilada por oxidação TEMPO (pré-tratamento químico) e trituração



Fonte: Nascimento et al. 2019.

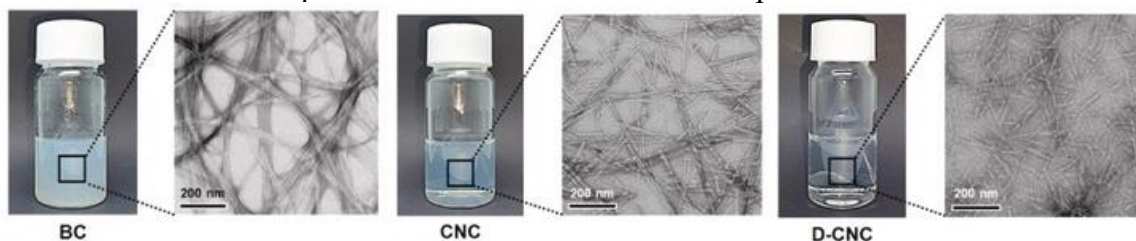
Dispersões aquosas concentradas de celulose nanofibrilada formam géis de alta viscosidade e mesmo em concentrações baixas como, por exemplo, 0,1% (m/v) formam géis viscosos (ISOGAI et al., 2018). Os géis formados são resultado do emaranhamento das fibrilas longas e cargas superficiais presentes, que podem ser moduladas através do controle da repulsão eletrostática por alteração do pH ou pelo uso de sais (ALVES et al., 2024; REID et al., 2023). Na celulose nanofibrilada as regiões amorfas e cristalinas se mantêm conservadas, como observado na Figura 7. As regiões amorfas são estruturas desordenadas e cineticamente mais acessíveis, fazendo com que os tratamentos químicos afetem essas regiões de maneira mais significativa. Quando essas regiões desordenadas são completamente hidrolisadas com um ácido forte, formam-se estruturas cristalinas em forma de bastão, o que chamamos de nanocristais de celulose.

3.2.2 Nanocristais de celulose

Nanocristais de celulose, também referidos como celulose nanocristalina ou *nanowhiskers* de celulose, são formados pela hidrólise das regiões desordenadas presentes nas

fibras de celulose, usando um ácido forte. A remoção seletiva das regiões desordenadas promove a quebra das cadeias longas de celulose, formando nanocristais de celulose (regiões cristalinas resistentes ao ácido) de tamanho coloidal e altamente cristalinos. Estes nanocristais formados possuem menores proporções de aspecto (C/d) comparado à celulose nanofibrilada, com diâmetro cerca de 3-50 nm, e comprimento na escala de centenas de nanômetros. Mas semelhante a celulose nanofibrilada, suas dimensões dependem da fonte de celulose. Ao contrário da celulose nativa, os nanocristais de celulose formam soluções totalmente homogêneas quando estabilizadas em soluções aquosas, com comportamento cristalino líquido dependente da concentração (GIRARD et al., 2024; VANDERFLEET et al., 2021; VASCONCELOS et al., 2017). A Figura 3.9 mostra a aparência e morfologia de nanocristais de celulose bacteriana antes e após diferentes tipos de tratamentos.

Figura 3.9 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de celulose bacteriana antes e após diferentes tipos de tratamentos: (BC) nanocelulose bacteriana natural, (CNC) nanocristais de celulose bacteriana por hidrólise com ácido sulfúrico e (D-CNC) nanocristais de celulose bacteriana por hidrólise com ácido sulfúrico e periodato de sódio



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Nam et al. 2021.

Muitos ácidos são usados para realizar a clivagem de regiões desordenadas da celulose, produzindo nanocristais de celulose, entre os quais o ácido sulfúrico é o ácido mais comum. Embora as regiões desordenadas sejam preferencialmente hidrolisadas, as regiões cristalinas também podem ser hidrolisadas em condições mais adversas, por exemplo em altas concentrações de ácido, resultando em nanopartículas menores e, eventualmente, cadeias totalmente solubilizadas (ARSERIM-UÇAR et al., 2021; DUFRESNE et al., 2012).

Associada à alta área de superfície, a celulose nanofibrilada e os nanocristais de celulose dispõem de numerosos sítios ativos (grupos hidroxila -OH), que podem ser quimicamente modificadas com uma variedade de grupos funcionais. Essas modificações permitem adaptar as propriedades interfaciais de substratos de nanocelulose ou ajustar seu equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico (HABIBI et al., 2014; OSONG et al., 2015). Técnicas

químicas, bioquímicas e mecânicas são usadas para fornecer abordagens para ajustar a nanocelulose e produzir propriedades aprimoradas visando aplicações práticas (BEJOY et al. 2018).

3.3 Propriedades das nanoceluloses e caracterização

O desempenho da celulose nanofrilada e dos nanocristais de celulose pode ser avaliado de forma geral com base em três propriedades-alvo: estabilidade coloidal em meio aquoso, tamanho e índice de cristalinidade. Estas propriedades são fundamentais para determinar o comportamento e a adequação das nanoceluloses em diferentes aplicações como na produção de materiais compósitos, revestimentos e estabilizadores de emulsões (CASTRIN et al., 2020; BENSELFELT et al., 2023).

A estabilidade coloidal refere-se à capacidade de partículas permanecerem uniformemente dispersas em um meio líquido, sem se agregarem ou sedimentarem. Isso é essencial para garantir que as dispersões de nanoceluloses tenham desempenho consistente em aplicações práticas (LOPES, 2020). Essa estabilidade é governada pela teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek, nomeada DLVO, que descreve o equilíbrio entre a atração de van der Waals e a repulsão eletrostática das partículas (HERNÁNDEZ, 2023).

A atração das forças de van der Waals ocorre devido a flutuações temporárias nas distribuições de elétrons em átomos e moléculas adjacentes, promovendo a agregação e a formação de aglomerados. A repulsão eletrostática resulta de cargas elétricas nas superfícies das partículas coloidais em meio líquido, formando camadas duplas elétricas ao redor de cada partícula. Quando duas partículas se aproximam, suas camadas duplas elétricas podem se sobrepor, gerando uma força de repulsão devido à interação eletrostática. Esta força de repulsão tende a manter as partículas separadas, promovendo a estabilidade da suspensão (BENSELFELT et al., 2023).

Portanto, se a força de repulsão for suficientemente forte para superar a força de atração, o sistema coloidal será estável, com as partículas permanecendo completamente dispersas no meio líquido. Caso contrário, se a atração de van der Waals predominar, as partículas tenderão a se agregar, resultando em uma suspensão instável. No caso de nanoceluloses pilosas, classe mais recente de nanocelulose, a estabilidade coloidal resulta da repulsão estérica ou eletroestérica (CASTRIN et al., 2020; DUFRESNE et al., 2019).

A afinidade entre as partículas e o meio também influencia a estabilidade dos sistemas coloidais. Partículas com alta afinidade pelo solvente (colóides liofílicos) aumentam a força de repulsão e promovem a estabilidade. Já partículas com baixa afinidade pelo solvente (colóides liofóbicos) aumentam a atração de van der Waals, levando à agregação e instabilidade (LOPES, 2020). Assim, nos colóides liofílicos, a afinidade com o solvente e a repulsão eletrostática dominam, enquanto nos colóides liofóbicos, a atração de van der Waals predomina, levando à instabilidade.

A alta estabilidade coloidal é essencial para produzir dispersões uniformes com desempenho previsível. O processamento do material, a reologia e a vida útil são altamente dependentes da estabilidade coloidal (CASTRIN et al., 2020). Durante algumas aplicações específicas as dispersões precisam se manter estáveis em uma ampla gama de temperaturas e condições químicas, exigindo alta estabilidade coloidal (LOPES, 2020).

A estabilidade coloidal de partículas carregadas pode ser inferida medindo a carga de superfície e o potencial de superfície, por meio de titulações condutométricas e medidas de mobilidade eletroforética, respectivamente (VANDERFLEET, 2021). A titulação condumétrica baseia-se na medição da condutividade elétrica de uma solução durante a adição de um titulante. A condutividade da solução muda à medida que íons são adicionados ou neutralizados, permitindo a determinação da carga de superfície das partículas presentes (STEFANO et al., 2011). As cargas de superfície nas nanoceluloses são resultado de grupos funcionais adquiridos no isolamento e processo de produção específicos, que influenciam as suas propriedades coloidais, estabilidade em suspensão e interações com outros materiais (BENSELFELT et al., 2023; SINGHSA et al., 2017).

O potencial zeta ou potencial eletrocinético pode ser calculado seguindo a teoria de Smoluchowski ou a equação modificada de Oshima–Overbeek, relatada recentemente (UEMATSU, 2024; LIN et al., 2019). Quando medimos o potencial zeta, estamos medindo o potencial elétrico no plano deslizante de um sistema de partículas. Uma partícula carregada atrairá contra-íons que se tornam mais difusos quanto mais longe da superfície da partícula. Esses contra-íons que viajam com a partícula definem o plano deslizante e seu potencial zeta associado. O potencial zeta não é uma propriedade da partícula, mas do sistema, que é composto pela partícula e o meio. Mudanças no meio, como concentração de íons, tipos de íons e pH, afetam o potencial zeta (MALVERN, 2014).

O valor do potencial zeta medido pode ser classificado amplamente em termos da

magnitude da carga. Valores absolutos de potencial zeta até 10 mV são classificados como altamente instáveis; entre 10 e 20 mV como relativamente estáveis; entre 20 e 30 mV como moderadamente estáveis; e acima de 30 mV como altamente estáveis (MALVERN, 2014; PATEL; AGRAWAL, 2011). A estabilidade coloidal também pode ser avaliada utilizando a transmissão de luz através de uma suspensão de nanoceluloses ou medindo o tamanho aparente das partículas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) ao longo do tempo, para determinar se e quando ocorre agregação ou sedimentação (METZGER, et al., 2021; STOCK et al., 2024).

As dimensões, formas e flexibilidade das nanoceluloses, também são determinantes para suas propriedades e desempenho (TANAKA et al., 2015, LU et al., 2021). Partículas em nanoescala e alta proporção de aspecto (C/d) possuem uma área de superfície maior em relação ao volume, ou seja, possui uma maior área de superfície disponível para interação com o meio, o que pode melhorar suas propriedades físicas e químicas, como reatividade, capacidade de ligação e formação de emulsões (BABAEI-GHAZVINI et al., 2022; DUNLOP et al., 2021; TEO et al., 2022;).

O tamanho e a forma das nanoceluloses também influenciam a capacidade de formar redes percolante e fases cristalinas líquidas, que são importantes em muitas aplicações (LEON et al., 2019; LIU et al., 2023). Redes percolante são estruturas interligadas que se estendem por toda a matriz de um material ou sistema. Em compósitos poliméricos, por exemplo, uma rede percolante de nanocelulose pode proporcionar melh significativas nas propriedades mecânicas, elétricas e de barreira do material (SILVÉRIO et al., 2014; XIONG et al., 2019). Em emulsões, a formação de redes percolante (estrutura tridimensional interconectada no interior da emulsão) pode encapsular e estabilizar as gotículas de óleo, prevenindo que elas coalesçam. Além disso, essas redes podem aumentar a viscosidade do sistema, dificultando a movimentação das gotículas e, conseqüentemente, melhorando a estabilidade física da emulsão (LU et al., 2021).

Em geral, nanoceluloses mais longas e com maior proporção de aspecto têm uma maior probabilidade de se sobrepor e se entrelaçar umas com as outras, facilitando a formação de uma rede percolante contínua (BABAEI-GHAZVINI et al., 2023). Porém, a carga de superfície e concentração de nanoceluloses também são consideradas, podendo facilitar ou impedir a formação de uma estrutura contínua, adequadamente dispersa dentro de uma matriz ou sistema. (JARDIN et al., 2020; SINCLAIR et al., 2019).

As fases cristalinas líquidas, ou cristais líquidos, são materiais que apresentam

propriedades intermediárias entre sólidos cristalinos e líquidos amorfos, caracterizando-os como uma mesofase. Como um líquido, possuem algum grau de isotropia, com propriedades uniformes em todas as direções, semelhante aos líquidos. No entanto, ao contrário dos líquidos amorfos, os cristais líquidos preservam uma ordem orientacional em uma direção específica, como nos sólidos cristalinos. Isso significa que suas moléculas, geralmente alongadas ou anisométricas, tendem a se alinhar em uma direção preferida, sem que isso implique em uma estrutura posicional rígida (THIRUGANASAMBANTHAN et al., 2022).

A auto-organização de fases cristalinas líquidas são facilmente alcançadas em suspensão coloidal de nanoceluloses do grupo dos nanocristais ou nanoesferas de celulose (LIU et al., 2023; LAGERWALL et al., 2014). As características da fase anisotrópica, bem como a faixa de concentrações em que essa fase aparece, dependem das dimensões da nanocelulose, da sua razão de aspecto, quiralidade, da química de superfície, além da força iônica da suspensão (KOROLOVYCH et al., 2018). A capacidade de formar cristal líquido pode melhorar as propriedades mecânicas e de barreira dos compósitos; e pode ser usada para controlar a liberação eficiente de medicamentos de sistemas de entrega direcionados (SINGH et al., 2024). Proporcionam também uma organização molecular que pode contribuir para a estabilidade de emulsões. A orientação das nanoceluloses na fase cristalina líquida pode criar barreiras estéricas ou eletrostáticas ao redor das gotículas de óleo, dificultando a coalescência, estabilizando a emulsão (PERRIN et al., 2023).

O tamanho das nanoceluloses pode ser medido por técnicas de microscopia, principalmente microscopia de força atômica (MFA), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou calculado através de espalhamento de nêutrons ou raios X em pequenos ângulos. Também pode ser inferido por métodos de espalhamento de luz, como DLS (Dynamic Light Scattering) ou espalhamento de luz a laser (GARAVAND et al., 2023; MAO et al., 2017).

As técnicas convencionais de microscopia são usadas como métodos diretos para observar e medir o tamanho das nanoceluloses. Essas técnicas permitem visualizar as nanoceluloses em alta resolução, revelando detalhes sobre sua forma e dimensão. Para garantir a precisão na análise da morfologia e dimensões das nanoceluloses é fundamental utilizar técnicas de preparo da amostra que minimizem fenômenos de emaranhamento de celulose nanofibrilada ou a aglomeração de nanocristais de celulose (CHEN et al., 2020; GARAVAND et al., 2023). Em geral, as dimensões de comprimento e diâmetro das nanoceluloses individuais

são medidas para obter uma média de no mínimo 50 estruturas para obter uma visão representativa de toda a amostra. Essas medidas são auxiliadas por ferramentas de software como ImageJ, DiameterJ, Gwyddion ou Gimp (HOTALING et al., 2015; ZHAO et al., 2024; VASCONCELOS et al., 2017; AIMONEN et al., 2022; AZMI et al., 2023).

As técnicas de espalhamento de nêutrons ou raios X calculam o tamanho das nanoceluloses com base no padrão de dispersão criada quando essas são irradiadas com nêutrons ou raios X. São técnicas utilizadas para estudar materiais em escala nanométrica, em que a difração de partículas fornece dados estatísticos sobre a estrutura e as dimensões médias das nanoceluloses em suspensões diluídas. A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo pode ainda ser combinada com o espalhamento de raios X a ângulo amplo para avaliar o estado cristalino da nanoceluloses (GARAVAND et al., 2023).

O método de DLS (Dynamic Light Scattering), também conhecido como espalhamento de luz a laser, é usado para medir o tamanho aparente (não o tamanho real) das nanoceluloses diluídas em suspensão aquosa. Essa técnica analisa a intensidade da luz espalhada com base no movimento aleatório (movimento browniano) das partículas dispersas (GAMELAS et al., 2015; FRASCHINI et al., 2014; GARAVAND et al., 2023) e fornece a distribuição do tamanho das amostras, quantificando a população das partículas em número, volume ou intensidade para cada intervalo de diâmetros hidrodinâmicos (TARRÉS et al., 2022; FRASCHINI et al., 2014). Quanto maior a partícula, mais lento será o movimento browniano. A velocidade de uma partícula sob movimento browniano é definida por seu coeficiente de difusão translacional, que por sua vez pode ser usado para determinar o raio hidrodinâmico das partículas (supondo que sejam duras e esféricas), conforme derivado da equação de Stokes-Einstein (FRASCHINI et al., 2014).

Embora o DLS ofereça uma forma simples e rápida para rastrear as partículas, os dados obtidos podem não representar fielmente a dimensão lateral das partículas, pois as nanoceluloses frequentemente possui diferentes razões de aspecto elevado, que induzem diferentes constantes de difusão translacional (FOSTER et al., 2018). No entanto, a análise de DLS pode trazer respostas importantes quando combinado com outras técnicas como a microscopia. O uso do DLS combinado com a microscopia de força atômica pode auxiliar na estimativa do comprimento da celulose nanofibrilada (GAMELAS et al., 2015). Nesse caso, o comprimento de nanofibrilas foi calculado com base na largura medida pelo MFA e no diâmetro hidrodinâmico obtido pelo DLS.

A técnica de DLS é usada como uma ferramenta útil para a avaliação de rotina da agregação ou estabilidade coloidal da nanocelulose em meios aquosos em diferentes setores industriais (REID et al., 2017; YANG et al., 2013; FALL et al., 2011). Em suma, embora não haja métodos padrão ou técnicas validadas disponíveis para a avaliação de tamanho de nanomateriais polidisperso com uma alta proporção, essas técnicas podem ser utilizadas de forma complementares, fornecendo uma estimativa do tamanho médio das nanoceluloses (FRASCHINI et al., 2014).

A terceira propriedade usada para avaliar o desempenho das nanoceluloses é o índice de cristalinidade. O índice de cristalinidade das nanoceluloses é uma medida que reflete o grau de organização das cadeias de celulose dentro das estruturas, ou seja, é a medida da proporção de regiões cristalinas em relação às regiões amorfas na estrutura da celulose (DAICHO et al., 2018). Como mencionado anteriormente, regiões cristalinas têm uma estrutura molecular altamente ordenada, enquanto as regiões amorfas são estruturas menos ordenadas dentro das cadeias de celulose.

Esse índice é importante porque uma maior cristalinidade geralmente está associada a propriedades mecânicas superiores, maior estabilidade térmica e menor solubilidade em água. Além disso, o índice de cristalinidade também serve como um indicador da eficiência do processo de produção das nanoceluloses, sugerindo o quão completa foi a reação que originou essas estruturas (SEPTEVANI et al., 2019). Pode ser usado ainda, para avaliar efeitos de processamentos, como a influência do tipo de secagem (PENG et al., 2013). Assim, ao avaliar o desempenho das nanoceluloses, a cristalinidade fornece informações importantes sobre a qualidade e as características funcionais do material.

Os nanocristais de celulose são o grupo de nanoceluloses em que predominam maiores índices de cristalinidade. O processo de obtenção por hidrólise ácida é capaz de remover os domínios de celulose amorfo, formando nanocristais de celulose (regiões cristalinas resistentes ao ácido) de tamanho coloidal e altamente cristalinos. Quanto menores as dimensões dos nanocristais de celulose obtido no processo de hidrólise, maior será o índice de cristalinidade. Ou seja, um encurtamento progressivo do tamanho do nanoceluloses obtido no processo de hidrólise é acompanhado por um aumento no índice de cristalinidade (WANG et al., 2019).

O índice de cristalinidade das nanoceluloses pode ser determinado por meio de diferentes técnicas, incluindo espectroscopia Raman, espectroscopia de RMN e difração de

raios X (DRX), como a mais amplamente utilizada (SALEM et al., 2023; PARK et al, 2010). A determinação do índice de cristalinidade das nanoceluloses por difração de raios X não requer calibração (CASTRIN et al., 2020). Essa técnica envolve a análise do padrão de difração gerado quando a amostra de nanocelulose é exposta a um feixe de raios X. Quando um feixe de raios X incide sobre uma amostra de nanocelulose, os átomos da amostra dispersam os raios em várias direções, conforme lei de Bragg (VARSHNEY et al., 2021). A difração resultante gera um padrão característico que é registrado por um detector. Este padrão consiste em picos de difração que correspondem a planos cristalinos específicos dentro da estrutura da nanocelulose.

No padrão de difração de raios X, os picos mais intensos e definidos são atribuídos às regiões cristalinas da celulose. Esses picos são usados para calcular a área correspondente às regiões cristalinas e o índice de cristalinidade. A técnica de difração de raios X é amplamente utilizada para essa finalidade devido à sua capacidade de diferenciar de forma mais clara entre as regiões cristalinas e amorfas na estrutura da nanocelulose. No entanto, a precisão dos resultados pode ser influenciada por fatores como a preparação da amostra, a qualidade do equipamento e os métodos de análise utilizados para interpretar o padrão de difração (SALEM et al., 2023). Apesar de seu uso generalizado, todos os valores de índice de cristalinidade determinados por DRX não são iguais como consequência de diferenças na preparação da amostra e procedimentos de ajuste de curva (CASTRIN et al., 2020).

Na espectroscopia Raman o índice de cristalinidade das nanoceluloses é determinado através da análise de características específicas das bandas vibracionais relacionadas à estrutura cristalina da celulose. Diferentes bandas correspondem a vibrações específicas das ligações químicas na estrutura da celulose. As bandas associadas às regiões cristalinas e amorfas da celulose possuem frequências distintas. Normalmente, as bandas em torno de 380 cm^{-1} e 1096 cm^{-1} estão associadas às regiões cristalinas, enquanto as bandas em torno de 857 cm^{-1} estão associadas às regiões amorfas. O índice de cristalinidade é então determinado pela razão entre a soma das intensidades das bandas cristalinas e a soma das intensidades das bandas totais (cristalinas + amorfas), sendo o resultado expresso em porcentagem (QUEIROZ et al., 2021).

A ressonância magnética nuclear é baseada nas propriedades magnéticas do núcleo atômico. O fenômeno de ressonância ocorre em uma frequência característica (frequência grave) no espectro eletromagnético quando os núcleos de certos átomos são colocados em um campo magnético forte. Várias técnicas de RMN diferentes são usadas para estudar a cristalinidade da

celulose. No entanto, um dos métodos de RMN mais amplamente utilizados é a separação do pico C4 das moléculas de celulose usando espectroscopia ^{13}C CP/MAS NMR. Nesse caso, dupletos de picos de C4 representam dois sinais diferentes no espectro de ^{13}C , e cada pico é atribuído a uma estrutura de celulose. Um dos picos (mais definido e estreito), localizado em aproximadamente 89 ppm, indica o carbono C4 em estruturas ordenadas de celulose no interior dos cristalitos, e outro pico (mais largo e difuso), localizado em aproximadamente 84 ppm, revela a natureza da celulose amorfa. O índice de cristalinidade é calculado a partir da razão entre as áreas dos sinais das regiões cristalinas e a soma das áreas dos sinais cristalinos e amorfos (SALEM et al., 2023).

Outras técnicas complementares também podem ser utilizadas para analisar o índice de cristalinidade de nanoceluloses e incluem a espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (ÅKERHOLM, M.; HINTERSTOISSER, B.; SALMÉN, L. et al., 2004; ŠIROKÝ et al., 2010), espectroscopia de vibração por geração de soma de frequências (BARNETTE et al., 2011; HUANG et al., 2020), calorimetria diferencial de varredura (KONG et al., 2002) e moléculas de ligação enzimática à celulose (KLJUN et al., 2011).

Essas propriedades dependem da fonte de celulose, das condições de isolamento e processo de produção, bem como dos possíveis pré ou pós-tratamentos. Portanto, definir a fonte de celulose e um processo de produção controlado para obter as propriedades desejadas são premissas importantes dentro do mercado em que as nanoceluloses estão inseridas e influencia a sua estratégia de uso (BENSELFELT et al., 2023).

3.4 Processos para obtenção de nanoceluloses bacteriana

A produção de nanoceluloses requer métodos de processamento específicos para reduzir o tamanho das fibrilas. Estes processos envolvem etapas que incluem a separação do material bruto do meio de cultura, purificação para remoção de impurezas bacterianas e a desfibrilação para obtenção das nanoestruturas fibriladas ou cristalinas.

A definição do processo de obtenção e eficiência dessas etapas determina a qualidade do produto e impacta diretamente seu rendimento e suas propriedades físico-químicas, como cristalinidade, tamanho e funcionalidade (KARGARZADEH et al., 2017). As estratégias de processamento e funcionalizações devem estar inseridas dentro de um conceito sustentável, visando aumentar o rendimento, reduzir custos e direcionar a aplicação das nanoceluloses

(NECHYPORCHUK et al., 2016). No direcionamento da aplicação das nanoceluloses, além das propriedades requeridas, devem ser consideradas as áreas de aplicação. Aplicações biomédicas, por exemplo, exigem maior grau de pureza do produto (YANG et al., 2017), enquanto aplicações alimentares inclui o rótulo *clean label*, que indica o uso de pouco processamento e poucos ingredientes, com ênfase para o natural, por exemplo (FOOD CHAIN MAGAZINE et al., 2024). A avaliação de todos esses fatores determina a escolha de um método frente a outro.

3.4.1 Separação e purificação da celulose bacteriana

A purificação e separação da celulose bacteriana do meio que contém nutrientes remanescentes da fermentação é uma etapa importante no processo de obtenção da celulose nanofibrilada e nanocristais de celulose bacteriana. Nessa etapa, as membranas de celulose são lavadas e fervidas com uma solução alcalina diluída (geralmente NaOH 2%) para promover o rompimento das células bacterianas. Após o tratamento com NaOH, as películas de celulose são lavadas repetidamente com água destilada até atingir o pH neutro (NASCIMENTO et al., 2021). O tratamento alcalino pode ser repetido para promover o rompimento completo das células bacterianas e remover fração de detritos celulares que possam estar ainda contidas nas fibras de celulose bacteriana. Podendo incluir aumento da concentração de álcali ou o acréscimo de tempo ou temperatura, seguido de ciclos de lavagem com água destilada.

A remoção de impurezas com solução diluída de NaOH pode aumentar as propriedades mecânicas da celulose bacteriana, por isso, pode também ser usada como um pré-tratamento (POLOUSE, A. et al. et al., 2022). Filmes de celulose bacteriana tratadas com solução de NaOH a 2,5% (m/m) apresentaram o dobro do módulo de Young em comparação com folhas não tratadas (GEA et al., 2011). No entanto, uma solução de NaOH acima de 6% causa deformação e encolhimento (REINIATI et al., 2016). O tratamento alcalino com soluções concentradas de NaOH danifica as microfibras de celulose bacteriana, diminui suas propriedades mecânicas e pode transformar a celulose I em celulose II em períodos prolongados de tratamento (GEA et al., 2011).

Na purificação por tratamento alcalino, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pode atuar sinergicamente com NaOH. O NaOH pode aumentar o pH do meio, o que potencializa a ação oxidante do H₂O₂, tornando o processo de purificação mais eficiente. Além disso, o NaOH ajuda

a abrir as estruturas fibrosas da celulose, permitindo que o H_2O_2 penetre melhor e atue de forma mais eficaz (LIMA et al, 2017). As membranas de celulose também podem ser purificadas em meios supercríticos, como o CO_2 supercrítico, fornecendo a inativação das bactérias e esterilidade, simultaneamente. Propondo redução de tempo de purificação por tratamento alcalino (PIGALEVA et al., 2019).

A Tabela 3.2 apresenta um resumo das condições da etapa de purificação da celulose bacteriana.

Tabela 3.2 – Condições de purificação da celulose bacteriana

Cepa	Meio de cultura	Solução alcalina	Temperatura	Tempo	Referência
<i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582	Hestrin & Schramm	NaOH 2% (m/v)	80 °C	2 ciclos de 1 h	Oliveira-Alcântara et al., 2020
<i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582	Hestrin & Schramm	KOH 5% (m/m)	Temperatura ambiente	1 ciclo de 12h	Hormaiztegui et al., 2021
<i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582	Hestrin & Schramm	NaOH 2% (m/v)	80 °C	2 ciclos de 1 h	Nascimento et al., 2021
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> GH-1/2008	Hestrin & Schramm	NaOH 1 M	80 °C	1 ciclo de 2 h	Gromovkykh et al., 2017
<i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 14666	Hestrin & Schramm	NaOH 0,1 M	100 °C	1 ciclo de 30 min.	Hannes et al., 2014
<i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 53582	Hestrin & Schramm	K_2CO_3 0,3 mol L ⁻¹	80 °C	1 ciclo de 1 h	Vasconcelos et al., 2020
<i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769	Suco de sisal	NaOH 1 N + H_2O_2 1% (v/v)	80 °C	1 ciclo de 1 h	Lima et al., 2017

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.2 Processos de obtenção de celulose nanofibrilada

A celulose nanofibrilada é obtida pela delaminação das fibras celulósicas através de processos mecânicos, para quebrar as ligações de hidrogênio interfibrilar em domínios cristalinos e amorfos e individualizar a celulose nanofibrilada (KALIA et al., 2014). Processos

mecânicos de moagem, homogeneização de alta pressão e microfluidização, são os métodos mais eficientes usados para desintegrar e reduzir o tamanho da fibrila de celulose, sendo considerados processos verdes (XU et al., 2022; NECHYPORCHUK et al., 2016; YAO et al., 2023). Outros processos usados incluem: refino, esmagamento criogênico, explosão de vapor, ultrassom, extrusão, contra-colisão aquoso e eletrofiação (FERNANDES et al., 2023).

No método convencional de moagem de alto cisalhamento a polpa passa por um par de pedras de moagem estática e giratória no instrumento (NASIR et al., 2017; PRADHAN et al., 2022). O processo de fibrilação no triturador rompe as ligações de hidrogênio e destrói as estruturas das paredes celulares usando forças de cisalhamento para transformar as matérias-primas celulósicas em fibras em nanoescala (ABDUL KHALIL et al., 2014). O grau de fibrilação depende da distância entre as pedras, a forma das pedras e do número de passagens (FERNANDES et al., 2023). Nesse método o ajuste da distância entre as pedras permite evitar problemas de obstrução (NECHYPORCHUK et al., 2016). A moagem de alto cisalhamento é um método simples e de baixo consumo de energia comumente usado, porém pode ter sua eficiência reduzida devido à dificuldade de ajustar a folga entre os dois discos após a redução gradual do tamanho da celulose. Além disso, o ajuste inadequado dos dois discos de moagem em alta velocidade de rotação resulta em colisão e atrito com fragmentos metálicos ou inorgânicos. Nesse método a celulose também é facilmente embutida nas ranhuras dos discos de moagem durante o processo, resultando em baixa uniformidade da nanocelulose (XU et al., 2022). Ainda, a moagem por cisalhamento produz celulose nanofibrilada com baixa cristalinidade e baixa estabilidade térmica (FERNANDES et al., 2023).

A moagem por bolas também é um método convencional para obter nanocelulose (PRADHAN et al., 2022). Nesse processo uma suspensão de celulose é colocada em uma concha cilíndrica oca parcialmente preenchida com esferas de material aço inoxidável, cerâmica, borracha (PIRAS et al., 2019) ou zircônia, por exemplo. A colisão de alta energia entre as esferas desintegra as fibras de celulose à medida que a concha gira (NECHYPORCHUK et al., 2016). Nesse tipo de moinho, a velocidade de rotação, o tempo de moagem, o tamanho das esferas, a relação entre o peso das esferas e o da celulose, o número de esferas e o estado seco ou úmido da celulose são fatores que influenciam a produção de nanocelulose na moagem por esferas (PRADHAN et al., 2022; PHANTHONG et al., 2018). O procedimento de moagem por esferas também é simples, possui baixo custo e sistema difícil de obstruir, e uma grande quantidade de matéria-prima pode ser processada simultaneamente. Além disso, devido à

presença de orifícios dentro da câmara, é fácil incorporar celulose durante o processo de moagem (XU et al., 2022). Algumas das limitações desse método incluem a geração de ruído, longos tempos de operação, alta contaminação (PIRAS et al., 2019), alto consumo de energia e a geração de grande quantidade de calor durante o processamento (TEO et al., 2020).

A homogeneização de alta pressão é considerada um método mecânico verde bem estabelecido, que tem sido amplamente utilizada para produzir celulose nanofibrilada em larga escala ou em escala laboratorial. Esta técnica envolve forçar a suspensão através de um canal ou orifício estreito usando um pistão, sob alta pressão constante (50–2000 Mpa), (PRADHAN et al., 2022; KARGARZADEH et al., 2017; YAO et al., 2023). A alta velocidade de fluxo da suspensão aumenta a pressão dinâmica e reduz a pressão estática, formando bolhas de gás que colapsam ao sair da lacuna de homogeneização, gerando ondas de choque e cavitações que rompem a estrutura fibrilar da celulose. A redução do tamanho das fibras ocorre devido à queda de pressão, forças de cisalhamento, fluxo turbulento e colisões entre partículas. A eficiência da fibrilação da celulose depende da pressão aplicada e do número de ciclos de homogeneização, sendo maior quanto maior a pressão (KARGARZADEH et al., 2017).

A microfluidização utiliza um princípio muito semelhante ao processo de homogeneização de alta pressão e, portanto, considerado um método mecânico verde para a produção em larga escala de celulose nanofibrilada na indústria. O microfluidizador combina as vantagens da microfluidização e da pressão ultra-alta (XU et al., 2022). No entanto, ao contrário de um homogeneizador operando a pressão constante, um microfluidizador funciona a uma taxa de cisalhamento constante (FERNANDES et al., 2023). A suspensão fluida é bombeada através de uma câmara em forma de Z ou Y (XU et al., 2022; ALMEIDA, R. O.; MALONEY, T.; GAMELAS, J. A. et al., 2023), onde atinge uma alta força de cisalhamento. A pressão pode alcançar níveis de até 40000 psi, ou aproximadamente 276 MPa. Microcanais de geometria fixa são posicionados dentro da câmara, pelos quais a suspensão de polpa acelera a altas velocidades. As forças requeridas de cisalhamento e impacto são geradas quando o fluxo da suspensão atinge superfícies resistentes ao desgaste. Uma série de válvulas de retenção permite a recirculação da suspensão. Ao sair da câmara de interação, o produto pode ser direcionado para um trocador de calor, recirculado pelo sistema para processamento adicional ou direcionado externamente para a próxima etapa do processo. Para alcançar o grau desejado de fibrilação, é necessário repetir o número de passagens no microfluidizador e usar câmeras de diferentes tamanhos (KARGARZADEH et al., 2017; MISSOUM et al., 2013). Menor

distribuição da dimensão da celulose nanofibrilada foi observada na técnica de microfluidização, quando comparado ao processo de homogeneização de alta pressão, devido à fácil dissociação das ligações de hidrogênio intermoleculares da celulose. Além disso, devido à alta pressão e alta tensão de colisão frontal, um tempo mais curto de processo foi requerido (LI et al., 2014; HU et al., 2011).

Para ambas as técnicas de processamento, homogeneizador de alta pressão ou microfluidizador, o alto consumo de energia e aglomeração das fibrilas são as principais limitações relacionada ao processo de produção de celulose nanofibrilada. Para superar essas limitações, que também é apresentada no processo de moagem, pré-tratamentos têm sido propostos para resolver esse problema e facilitar a produção em escala (MISSOUM et al, 2013). Aplicação de pré-tratamentos como oxidação mediada por TEMPO e hidrólise enzimática são comumente utilizados (XIE et al. 2018).

A hidrólise enzimática é uma alternativa ecologicamente correta, que pode ser utilizado como pré-tratamento para fabricar celulose nanofibrilada com um consumo de energia significativamente reduzido. As enzimas agregam vantagem, pois são moléculas bioquímicas atóxicas que se degradam ambientalmente e não produzem subprodutos que causem impactos ambientais negativos (ARANTES et al., 2020).

As enzimas celulolíticas, ou celulasas, como são comumente chamadas, ajudam a hidrolisar fibras celulósicas. Três enzimas fazem parte do grupo das celulasas: endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases (KARGARZADEH et al., 2017). As endoglucanases agem na região interna da fibra de celulose e liberam compostos menores formados por poucas unidades de glicose, os chamados oligossacarídeos (açúcares pequenos). As exoglucanases agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de glicose (livres) ou celobiose, que são compostos menores, formados por duas unidades de glicose. As beta-glicosidases quebram a ligação química existente entre as duas unidades de glicose que formam a celobiose, liberando unidades de glicose (livres) (UNESP, 2024). O uso de enzimas foi relatado por melhorar a acessibilidade, hidratação e inchaço da celulose, o que reduz a energia necessária durante os processos mecânicos. podem melhorar também a uniformidade do tamanho da celulose nanofibrilada e promover maiores rendimentos, o que contribui para aumentar a viabilidade econômica da produção em larga escala da celulose nanofibrilada (SQUINCA et al., 2022). No entanto, o tempo de reação relativamente longo, tipicamente variando de 2 a 72 h, torna o pré-tratamento enzimático extenso, requerendo um tempo mais longo do que, por

exemplo, o pré-tratamento mediado por TEMPO (reação de 2 h) (ARANTES et al., 2020).

A oxidação mediada por 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO) é o pré-tratamento químico mais amplamente utilizado para obter celulose nanofibrilada (PRADHAN et al., 2022), sendo o procedimento mais simples e eficiente para a introdução de funcionalidades em fibras de celulose (MILANOVIC et al., 2020). Sua produção requer menos energia do que celulose nanofibrilada produzida via hidrólise enzimática. a oxidação é definida como a perda de elétrons por uma espécie em uma reação química. É uma modificação utilizada nas nanoceluloses para dotá-las com carga superficial e estabilidade eletrostática. Nesse processo, o TEMPO atua como um catalisador redox e é ativado em meio aquoso na presença dos agentes oxidantes, hipoclorito de sódio (NaClO) e brometo de sódio (NaBr). É um radical livre estável capaz de oxidar seletivamente os grupos hidroxila primários (-CH₂OH) localizados na posição C6 da celulose (PITCHER et al., 2023). O TEMPO oxida o grupo hidroxila primário na celulose, convertendo-o em um grupo aldeído (-CHO). Em presença contínua de NaOCl e NaBr, o grupo aldeído é rapidamente oxidado a um grupo carboxila (-COOH), completando a oxidação. Após oxidar o grupo hidroxila, o reagente TEMPO se reduz a uma forma inativa. O NaOCl reoxida o TEMPO para que ele possa participar de mais ciclos de oxidação, tornando o processo eficiente e contínuo.

O conteúdo de grupo carboxila presente nas nanoceluloses fornece cargas superficiais negativas que ajudam a repelir as fibras umas das outras, prevenindo a agregação e conferindo estabilidade eletrostática à suspensão. As nanofibras de celulose obtidas são de pequeno tamanho lateral, tornando possível fornecer dispersões quase transparentes e altamente viscosas (KALIA et al., 2014, SAITO et al., 2007). Essas características são importantes para manter as nanoceluloses dispersas em soluções, facilita a desfibrilação, a redução do tamanho das fibrilas e a sua aplicação (PATIL et al., 2021).

Contudo, o método apresenta desvantagem com relação ao impacto ambiental, devido ao uso de reagentes halogenados; dificuldades na reciclagem (processos de circuito fechado) e questões de custo, pois TEMPO é um reagente caro. Uma preocupação mais séria surge do fato de que reagentes à base de haleto, por exemplo, hipoclorito de sódio e brometo de sódio, são usados como co-oxidantes (MILANOVIC et al., 2020; ZHANG et al., 2020; CARLSSON et al., 2014). Uma limitação adicional é que, embora o processo tenha sido implementado pela primeira vez há cerca de 25 anos, ainda não há um processo comercial em operação (BRAGD et al., 2004).

Outros agentes oxidantes relatados como pré-tratamento inclui persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈, APS), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e clorito de sódio (NaClO₂) para realizar a oxidação. A seletividade de cada oxidante em relação aos diferentes grupos hidroxila na celulose resulta em modificações diferentes, levando a nanoceluloses com morfologias e propriedades variadas (PITCHER et al., 2023).

Pré-tratamentos mecânicos como misturador de cisalhamento ultra-turrax, moinho coloidal, reator termostático, liquidificador, moagem de alto cisalhamento, também são relatados como parte do processamento de obtenção de celulose nanofibrilada (PIROZZI et al., 2021; KARANDE et al., 2011; ZIMMERMANN et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2021).

A Tabela 3.3 apresenta diferentes artigos científicos envolvendo o uso dos processos convencionais para obtenção de celulose nanofibrilada, método de processamento, pré-tratamento e área de aplicação.

Tabela 3.3 – Processos convencionais para obtenção de celulose nanofibrilada, método de processamento, pré-tratamento e área de aplicação

Fonte da celulose	Método	Pré-tratamento	Área de aplicação	Referência
Celulose comercial ou Celulose de bagaço de tomate	Moagem de bolas	--	Alimentar	PIROZZI et al., 2021
	Homogeneizador de alta pressão	Misturador de cisalhamento (Ultra Turrax T-25)	Alimentar	
Madeira	Extrusão de parafuso duplo	Oxidação TEMPO	Biomédica	PATIL et al., 2022
	Moagem de alto cisalhamento	Oxidação TEMPO	Biomédica	
Madeira ou Palha de trigo	Microfluidizador	Reator termostático	--	ZIMMERMANN et al., 2010
Algodão	Moagem de alto cisalhamento	--	--	KARANDE et al., 2024
Madeira	Homogeneizador de alta pressão	Liquidificador + Moagem de alto cisalhamento	--	STELTE et al., 2009
Madeira	Moagem	Hidrólise enzimática	--	RIBES et al., 2021
Palha de trigo	Homogeneizador de alta pressão	Hidrólise enzimática	Papel	ESPINOSA et al., 2019
	Moagem de alto cisalhamento	Hidrólise enzimática	Papel	
	Extrusão de	Hidrólise	Papel	

	parafuso duplo	enzimática		
Quitosana	Contracolisão aquosa	Oxidação TEMPO	Alimentar	HAI et al., 2020
Polpa de bagaço	Microfluidizador	Oxidação TEMPO	Farmacêutica	WANG et al., 2020
Bactéria	Microfluidizador	--	Biomédica Farmacêutica	ANDRADE et al., 2019
Madeira	Homogeneizador de alta pressão	Refino	--	BALEA et al., 2021
	Homogeneizador de alta pressão	Oxidação TEMPO	--	
	Homogeneizador de alta pressão	Hidrólise enzimática	--	
Bactéria	Microfluidizador	--	Biomédica	ANDRADE et al., 2019
Algodão	Oxidação mediada por TEMPO	--	Alimentar	LI et al., 2023
Bactéria	Moinho coloidal	Oxidação TEMPO	Alimentar	NASCIMENT O et al., 2021
Celulose comercial	Homogeneizador de alta pressão	--	Embalagem	YAO et al., 2023

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a descoberta dos métodos de pré-tratamento que visam facilitar a desintegração mecânica, a celulose nanofibrilada se tornou um material mais atraente para aplicações comerciais. no entanto, as pesquisas continuam focando na otimização das técnicas existentes e no desenvolvimento de métodos mais sustentáveis, visando beneficiar o processo produtivo, o produto de aplicação e ou dotar a celulose nanofibrilada de novas propriedades de interesse (NECHYPORCHUK et al., 2016).

3.4.3 Processos de obtenção de nanocristais de celulose

Para a obtenção de nanocristais de celulose, o método mais utilizado é a hidrólise de ácidos inorgânicos fortes, que é capaz de degradar a região amorfa da celulose, preservando a região cristalina e formando os nanocristais em forma de bastonete (ZHANG et al., 2020). Esse método é fácil e rápido, e possui aplicação bem estabelecida em escala industrial, tendo sido comprovada como uma solução eficaz para a geração de nanocristais com alto grau de pureza (NOREMYLIA, et al., 2022).

A hidrólise é uma reação química que envolve a clivagem das ligações químicas por água. A hidrólise ocorre quando as moléculas de água clivam as cadeias de celulose na ligação glicosídica, que são as ligações entre as unidades de glicose na cadeia de celulose. Isso ocorre quando as moléculas de água atacam um carbono em ambos os lados da ligação glicosídica, resultando na quebra da ligação acetal (ligação específica entre as unidades de glicose) (PITCHER et al., 2023). A clivagem ácida das ligações glicosídicas é atribuída a diferenças na cinética de hidrólise entre regiões amorfas e cristalinas. Os íons hidrônio penetram preferencialmente no domínio amorfo desordenado e frouxamente agrupado em vez da região cristalina compactada (REINAITI et al., 2017).

Diferentes ácidos inorgânicos podem ser usados para essa finalidade, como ácidos clorídrico (HCl), fosfórico (H₃PO₄), maleico (C₄H₄O₄), bromídrico (HBr), nítrico (HNO₃) e fórmico (CH₂O₂) (KARGARZADEH et al., 2017). No entanto, as preparações de nanocristais, geralmente usam ácido sulfúrico ou ácido clorídrico (CASTRIN et al., 2020; REINAITI et al., 2017).

No processo de hidrólise com ácido sulfúrico, a celulose purificada é suspensa em uma solução concentrada do ácido. O processo de hidrólise ocorre sob condições controladas de temperatura (geralmente entre 40°C e 70°C), tempo e agitação. A concentração do ácido também é regulada, normalmente variando entre 60% e 70% em peso (POULOSE et al., 2022; XU et al., 2022). Após o tempo de reação requerido, a reação é interrompida, geralmente pela adição de água fria, o que dilui o ácido e interrompe o processo de hidrólise. Em seguida, a suspensão é submetida a sucessivas etapas de centrifugação e lavagem para remover o ácido sulfúrico. A neutralização completa ocorre por diálise com água destilada, realizada para remover o ácido livre da dispersão (KARGARZADEH et al., 2017; CASTRIN et al., 2020).

Uma hidrólise incompleta é observada quando a concentração de ácido sulfúrico é inferior a 63%. Neste processo, são produzidas partículas com baixa cristalinidade e pequenas quantidades de polímeros amorfos e aromáticos são dissolvidas. Por outro lado, foi observada produtividade aumentada quando a concentração de ácido sulfúrico varia entre 63% e 64% e a temperatura está entre 45°C e 60°C, para um tempo de processo entre 30-120 min. Quando a concentração de ácido sulfúrico é maior do que 65% em massa, existe ainda a possibilidade de inchaço da região cristalina (XU et al., 2022).

O processo de hidrólise com ácido sulfúrico também introduz grupos ésteres sulfato nos nanocristais produzidos, resultante da esterificação parcial dos grupos hidroxila. Estes

grupos conferem uma carga negativa à superfície dos nanocristais que mantém a dispersibilidade dos nanocristais por meio das forças eletrostáticas de repulsão, muito eficiente em prevenir a agregação dos nanocristais (PATIL et al., 2022; NOREMYLIA et al., 2022; KARGARZADEH et al., 2017). Portanto, os nanocristais resultantes desse processo, em condições específicas, são estruturas altamente cristalinas com grupos de superfície de ésteres de sulfato desprotonados que atendem a todas as propriedades alvo discutidas na seção anterior. Isso torna a hidrólise com ácido sulfúrico o protocolo mais estudado e mais amplamente usado para produzir nanocristais e para hidrolisar e esterificar celulose (CASTRIN et al., 2020).

A hidrólise de ácido clorídrico é o segundo método mais usado para a preparação de nanocristais de celulose. A eficiência da hidrólise do ácido clorídrico dos nanocristais de celulose é reforçada a uma concentração de ácido de 2,5-6,0 N e uma temperatura de 60-105°C, utilizando tempo de processo entre 120-240 min. Em comparação com a hidrólise do ácido sulfúrico, os nanocristais hidrolisados por ácido clorídrico não possuem grupos carregados na superfície. Desse modo a dispersibilidade do produto em água é limitada, resultando em fácil agregação e floculação, o que limita significativamente sua aplicação (XU et al., 2022; WANG et al., 2023). Apesar da ausência de carga, a hidrólise de ácido clorídrico apresenta rendimentos acima de 80% e maior estabilidade térmica dos nanocristais (YU et al., 2013; ZULNAZRI et al., 2024; VASCONCELOS et al., 2017).

A principal preocupação dos métodos de hidrólise ácida é a água residual ácida gerada a partir do processo de lavagem, a fim de neutralizar o valor de pH da suspensão da nanocelulose. O processo de lavagem é geralmente realizado pela adição de água fria seguida de centrifugação e diálise até que o pH neutro seja atingido. Todo esse processo demanda o uso de elevado volume de água e, por consequência, a geração de águas residuais ácidas (FERNANDES et al., 2023; PHANTHONG et al., 2018).

Uma alternativa é adicionar uma solução alcalina para neutralizar a suspensão de nanocristais. Hidróxido de sódio tem sido relatado como o principal álcali usado, resultando na formação dos grupos sulfato de sódio. Nesse processo, o consumo de água é reduzido, pois suprime a fase de diálise, que pode durar dias de troca de água para neutralidade total da suspensão (MAITI et al., 2013; WANG et al., 2007; ZHANG et al., 2022). Quando os grupos de sulfato ácido da superfície dos nanocristais de celulose foram neutralizados pela solução NaOH, sua degradação térmica mudou consideravelmente para a temperatura mais alta. Esta observação indicou que o método de utilização da solução de NaOH neutralizou os grupos de

sulfato de ácido, melhorando também a estabilidade térmica dos nanocristais de celulose (WANG et al., 2007).

A estabilidade térmica é uma importante propriedade para aplicação como enchimento de reforço em compósitos de polímeros, como por exemplo, os termoplásticos, em que a temperatura de processamento muitas vezes excede 200°C (WANG et al., 2007). Porém, a amplitude de sua aplicação depende da avaliação de outras propriedades. Para a aplicação como estabilizadores em emulsões Pickering, por exemplo, a formação de sais de sulfato pode não ser interessante, já que a presença de alta concentração de sal impede a formação de emulsões estáveis. No caso, estudos para ajustar parâmetros de processo pode ser útil, considerando a aplicação proposta.

A motivação no estudo dos nanocristais de celulose inclui principalmente, o desenvolvimento de novos métodos de extração como um passo fácil e com menos ou sem águas residuais. Enquanto as propriedades e o rendimento do nanocristal obtido devem ser mantidos ou superar os métodos tradicionais (PHANTHONG et al., 2018).

A Tabela 3.4 apresenta diversos estudos que exploram o uso de processos de hidrólise ácida para a obtenção de nanocristais de celulose, aplicados em emulsões Pickering, detalhando o tipo de ácido utilizado e os métodos de neutralização empregados.

Tabela 3.4 – Processos de hidrólise ácida para a obtenção de nanocristais de celulose aplicado a emulsões *Pickering* descrevendo o tipo de ácido e o tipo de neutralização

Fonte de celulose	Tratamento ácido	Neutralização	Referência
Aspargos	Hidrólise de ácido sulfúrico	Diálise	WANG et al., 2016
Polpa de bambu Tecido de algodão Polpa de madeira	Hidrólise de ácido fosfórico + homogeneização de alta pressão	Ajuste de pH para 7	LI et al., 2019
Farelo de arroz desfasado	Hidrólise de ácido sulfúrico + sonicação	Diálise	ANGKURATIPAKORN et al., 2017
Conchas de sementes de Ginkgo	Hidrólise de ácido sulfúrico + homogeneização de alta pressão	Diálise	NI et al., 2020
Sementes de limão	Hidrólise de ácido sulfúrico	Diálise	DAI et al., 2021
Sementes de limão	Hidrólise de ácido sulfúrico + oxidação TEMPO	Diálise	ZHANG et al., 2020

Conchas de pistaquio	Hidrólise de clorídrico + Modificação com OSA	de ácido	Diálise	KARISI et al., 2018
Macroalga (<i>Eucheuma cottonii</i>)	Hidrólise fosfórico	de ácido	Diálise	TIONG et al., 2020
<i>Acetobacter xylinum</i> CGMCC 5173	Hidrólise sulfúrico	de ácido	Diálise	YAN et al., 2019

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Nanocelulose como estabilizadores de emulsões Pickering em alimentos

As emulsões constituem a base de uma ampla gama de produtos, incluindo principalmente, alimentos, cosméticos e itens de cuidados pessoais (EMULSIFIERS MARKET et al., 2024). Geralmente, essas bases são formadas a partir da mistura de dois ou mais líquidos imiscíveis, sendo particularmente comuns as emulsões formadas por gotas de óleo dispersas em água (MCCLEMENTS et al., 2017).

Em produtos alimentícios, gotículas lipídicas fornecem atributos físico-químicos e sensoriais desejáveis, como aparência, textura, estabilidade, aroma, sensação na boca e sabor (MCCLEMENTS et al., 2015). Além disso, emulsões óleo em água são amplamente usadas para encapsular, proteger e fornecer compostos bioativos lipofílicos, como sabores, cores, vitaminas, nutrientes, nutracêuticos, antimicrobianos e antioxidantes (MCCLEMENTS et al., 2016).

Por se tratar de dois líquidos imiscíveis, as emulsões de óleo em água são sistemas termodinamicamente instáveis que tendem a se separar em suas fases originais de óleo e água com o tempo. Isto é decorrente da tendência natural do sistema líquido-líquido se separar para reduzir a sua energia livre de Gibbs. Em direção a uma estrutura termodinâmica para descrever o mecanismo de emulsificação, a formação de uma emulsão é espontânea se a energia livre de Gibbs for menor que zero. No entanto, é necessário fornecer uma certa quantidade de energia à mistura para provocar a mudança desejada na energia livre, caso a energia livre de Gibbs seja maior que zero. Esse requisito de energia pode ser suprido pela adição de emulsificantes, que podem reduzir a tensão interfacial e promover a dispersão das gotas, diminuindo assim a quantidade de energia necessária para formar uma interface (WANG et al., 2017).

A diminuição da tensão interfacial, que leva à diminuição na energia livre interfacial,

é a primeira principal função de um emulsificante. A segunda é o retardamento do processo de coalescência das gotas e separação das fases, que é realizado através da formação de um tipo de filme ou barreira para a nova interface líquido-líquido pelo emulsificante (MYERS, 1999; SANTAMARIA-ECHART et al., 2021). Dessa forma, os emulsificantes fornecem aos produtos comerciais vida útil longa e resistências às tensões ambientais (MCCLEMENTS, 2015).

Muitos dos emulsionantes mais eficazes atualmente utilizados em produtos alimentícios são sintéticos, como ésteres de sorbitano, etoxilatos de álcoois graxos e ésteres de sacarose (MCCLEMENTS et al., 2017). No entanto, a demanda pelo uso de ingredientes naturais e sustentáveis em produtos alimentícios está crescendo, devido aos benefícios que oferecem à saúde e a promoção de métodos de produção industrial mais sustentáveis (SCHUERMANS, 2024; GRANATO et al., 2023; SANTAMARIA-ECHART et al., 2021). Por esta razão, muitos fabricantes de alimentos estão buscando substituir emulsionantes sintéticos por alternativas naturais, bem como tentar substituir ingredientes de origem animal por ingredientes à base de plantas ou base biológica (EMULSIFIERS MARKET et al., 2024; ASKEW et al., 2022; MCCLEMENTS et al., 2021; EFSA, 2024).

Diferentes tipos de emulsionantes naturais podem ser usados em alimentos, como fosfolipídios (ex. lecitina de soja), biossurfactantes (ex. ramnolipídios), proteínas (ex. lactoferrin; proteína de soro de leite) e polissacarídeos (ex. goma arábica) (ÖZTÜRK et al., 2014; AZEVEDO et al., 2023; MARQUES et al., 2023; PRASAD et al., 2022). Esses emulsionantes são úteis, mas apresentam algumas limitações que impedem o amplo uso para as diferentes categorias de alimentos na indústria, como ocorre com os emulsificantes sintéticos.

Normalmente, os polissacarídeos de superfície ativos precisam ser usados em níveis relativamente altos para produzir pequenas gotículas, mas as gotículas formadas são altamente resistentes a mudanças ambientais. Por outro lado, as proteínas ativas na superfície são tipicamente utilizadas em níveis baixos, mas as gotículas formadas são altamente sensíveis a mudanças no pH, força iônica e temperatura. Certos fosfolipídios são capazes de produzir pequenas gotículas de óleo durante a homogeneização, mas assim como as proteínas, as gotículas formadas são altamente sensíveis a mudanças nas condições ambientais. Os biossurfactantes podem ser utilizados em níveis baixos para formar gotículas de óleo fina que permanecem estáveis em uma variedade de condições ambientais (MCCLEMENTS, 2016). No entanto, alguns biossurfactantes podem ser produzidos por bactérias patogênicas. Glicolipídeos como os ramnolipídeos e lipídios da trealose são produzidos principalmente por cepas

bacterianas como *Pseudomonas aeruginosa* e, nesses casos, atenção especial deve ser direcionada para os aspectos de segurança, que limitam a aplicação prática em alimentos (RIBEIRO et al., 2020; MOUTINHO et al., 2020).

Com o intuito de superar essas limitações existentes, uma grande quantidade de pesquisas sobre a capacidade estabilizante de novos emulsificantes de bases naturais tem sido realizada (KIERULF et al., 2020; GUMUS, et al., 2017; FRANCISCO et al., 2020; JOYE, et al., 2014; KOOCHKEI et al., 2009). A combinação sinérgica de emulsificantes naturais também tem sido relatada para fornecer propriedades complementares (RAWAL et al., 2023; MARTINS et al., 2024; JIAO et al., 2022). A substituição parcial do estabilizante de base natural por emulsificantes naturais se apresenta como outra alternativa (MARTINS et al., 2023).

Alinhado com os emulsificantes de bases naturais, a nanocelulose surgiu como uma alternativa sustentável em emulsões do tipo Pickering relacionadas a alimentos, devido às suas propriedades favoráveis, como renovabilidade, baixa toxicidade, anfifilicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e alta razão de aspecto (JI et al., 2023; SANTAMARIA-ECHART et al., 2021; LI et al., 2021). Nanocelulosas atuam como partículas sólidas adsorvidas na interface óleo/água, mostrando maior resistência à coalescência de gotículas e melhores respostas elásticas do que as emulsões estabilizadas por emulsificantes sintéticos (BINKS, 2002; GOI et al., 2019; CAPRON et al., 2018).

Nas emulsões Pickering, partículas sólidas utilizadas como estabilizadores/emulsionantes possuem uma molhabilidade parcial em ambas as fases imiscíveis (água e óleo). A energia necessária para remover uma partícula da interface é significativamente maior do que a energia térmica ambiente, o que resulta em processos de adsorção praticamente irreversíveis. Esse comportamento confere às emulsões Pickering uma alta estabilidade contra coalescência, diferentemente dos emulsificantes convencionais, que estabilizam a emulsão por meio da adsorção de moléculas anfifílicas na interface óleo/água. A afinidade dessas moléculas pela água ou pelo óleo é expressa pelo Número de Balanço Hidrofílico-Lipofílico (BHL), onde um valor maior indica maior afinidade pela água (hidrofílica) e um valor menor indica maior afinidade pelo óleo (lipofílica). Em contraste, a tendência das partículas sólidas em emulsões Pickering é descrita por sua molhabilidade, medida pelo ângulo de contato, que determina se a partícula favorecerá a formação de emulsões óleo-em-água ou água-em-óleo (BINKS, 2002).

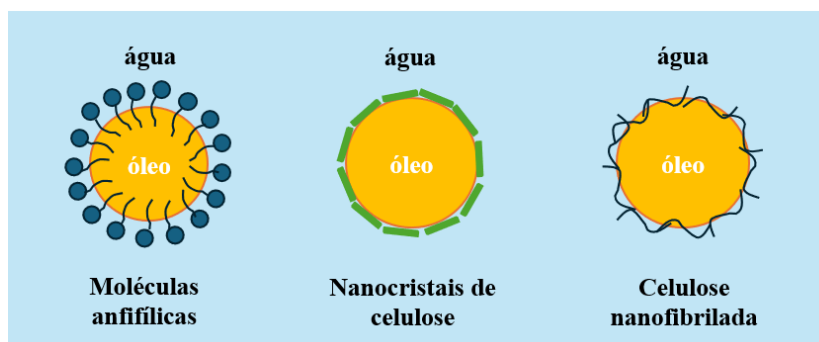
Os emulsionantes convencionais moleculares estabilizam as emulsões ao reduzir a

tensão interfacial entre as fases de óleo e água, facilitando a deformação e ruptura das gotículas de óleo durante a energia fornecida ao sistema. Isso resulta na formação de pequenas gotas revestidas por uma camada de moléculas de emulsionante, que cria uma forte repulsão (geralmente estérica e/ou eletrostática) que inibe a agregação das gotículas. Enquanto os emulsionantes particulados, que são parcialmente molhados pelas fases de óleo e água, tendem a se adsorver nas interfaces sem causar uma grande redução na tensão interfacial. Como resultado, a formação de pequenas gotas é mais difícil durante a homogeneização, devido à tensão interfacial relativamente alta. Isso significa que as gotículas não têm estabilidade muito boa contra a separação gravitacional (CUI et al., 2021; MCCLEMENTS et al., 2016). Entretanto, em comparação com as emulsões estabilizadas com surfactantes convencionais, as emulsões Pickering requerem menos porções de estabilizantes durante todo o processo de preparação (BELTRÁN et al., 2022).

Além disso, partículas agregadas podem se formar na fase contínua que envolve as gotículas, formando uma rede tridimensional que inibe seu movimento. Ainda, as interações de depleção podem aumentar a atração entre as partículas, levando à formação de uma rede de partículas 3D que inibe o movimento das gotículas. Portanto, o mecanismo de estabilidade baseado na adsorção de partículas sólidas é mais eficaz na prevenção da desestabilização da emulsão em algumas condições ambientais, como alteração de pH, força iônica, tratamento mecânico e condições de temperatura (BELTRÁN et al., 2022; CUI et al., 2021; JI et al., 2023; RIBEIRO et al., 2023).

A Figura 3.10 mostra emulsões Pickering formadas por partículas sólidas (celulose nanofibrilada e nanocristais de celulose) e a emulsão convencional formada por moléculas anfifílicas em interfaces óleo/água.

Figura 3.10 – Emulsões Pickering formada por partículas sólidas (celulose nanofibrilada e nanocristais de celulose) e a emulsão convencional formada por moléculas anfifílicas em interfaces óleo/água



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os diferentes tipos de nanoceluloses, incluindo nanofibrilas de celulose nanocristais de celulose de diferentes fontes, foram aplicados com sucesso para formar emulsões Pickering estáveis, que são resumidos na Tabela 3.5. Muitas pesquisas têm se concentrado na produção de sistemas de emulsões Pickering de grau alimentício estabilizados por nanoceluloses (HUBBE et al., 2017; KHAN et al., 2018; LI et al., 2018; SALAS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2010; JI et al., 2023; ZHANG et al., 2022; LI et al., 2021).

Tabela 3.5 – Resumo de artigos científicos recentes que relatam produção de emulsões de Pickering estabilizadas por nanocelulose de grau alimentício

Nanocelulose		Emulsão Pickering			Referências
Tipo	Fonte	Tamanho	Concentração da nanocelulose (m/v)	Fase óleo [razão óleo:água]	
Cristal	Atiragem de bambu	Largura: 24-50 nm Comprimento: 406-1500 nm	0,025-0,25% (m/v)	Óleo de milho [1:9; 3:7; 5:5; 7:3] (v/v)	NI et al., 2020
	Algodão	Altura: 6 nm	0,3-0,9% (m/m)	Óleo de coco [1:4] (v/v)	HEDJAZI et al., 2018
	Semente de limão	Largura: 12-42 nm Comprimento: 130-380 nm	0,5; 1,0% em massa	Óleo de girassol [50%] (m/m)	ZHANG et al., 2020
	Casca de pistache	Diâmetro: 68,8 nm	0,1-1,5% (m/v)	Óleo de milho [10%] (v/v)	KASIRI et al., 2018
	Aspargo	Diâmetro: Dezenas de nanômetros Comprimento: 200 nm	0,1-1,0% em massa	Óleo de palma [3:7] (v/v)	WANG et al., 2016
Fibrila	Bamboo shoot	Largura: 24,93-32,78 nm Altura: 5,03–6,77 nm	0,05-0,3% em massa	Dodecane [1:9; 1:5; 3:7] (v/v)	HE et al., 2020
	Casca da banana	Diâmetro: 3,3-3,5 nm Comprimento:	0,01% (m/m)	Óleo de girassol	COSTA et al., 2018

1492–3493 nm		[10%] (m/m)		
Kelp	Largura: 10-20 nm Comprimento: 0,6–1 µm	0,075-0,9% em massa	Óleo de girassol [1:4; 2:3; 1:1] (v/v)	WU et al., 2020
Oil palm fruit bunch	Largura: 4 nm Comprimento: A few microns	0-2% em massa	Dodecan [1:4] (v/m)	LI et al., 2020
<i>Flammulina velutiper</i>	Largura: 24,01- 30,15 nm Atura: 4,77–6,77 nm	0,1-0,6 % em massa	Dodecano [20, 30, 40%] (v/v)	HE et al., 2020
<i>Miscanthus floridulus straw</i>	Largura: 33,27- 49,79 nm Altura: 3,68–7,55 nm	0,05-0,20 % em massa	Dodecano [1:9] (v/v)	LI et al., 2019
<i>Acetobacter xylinus</i>	Largura: 96,67– 127,34 nm Altura: 6,38–12,77 nm	0,1-0,5 % em massa	Dodecano [1:9; 1:4; 3:7; 2:3; 1:1] (v/v)	LI et al., 2019
<i>Komagataeib acter xylinus</i>	Diâmetro: 30–80 nm Comprimento: 100 nm a vários micrômetros	0,01-0,09 % (m/v)	Peanut oil [5, 10, 15, 25, 30%] (v/v)	ZHAI et al., 2018
<i>Gluconacetob acter xylinus</i>	Largura: 5–10 nm	0.18–0.70 % em massa	Liquid paraffin [1:1] (v/v)	JIA et al. 2016

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparada à biomassa lenhosa, os recursos agrícolas contêm menor teor de lignina, exigindo, assim, pré-tratamentos mais suaves, que requer menor consumo de produtos químicos

e energia no processo de extração de nanoceluloses (ALMASHHADANI et al., 2022). Os resíduos agrícolas, particularmente, demonstram ser uma excelente matéria-prima celulósica devido ao seu baixo custo e sustentabilidade, despertando grande interesse na extração de nanoceluloses (OXONUBI et al., 2021; MARIÑO et al., 2021). Exemplos incluem pomácia de maçã (MELIKO'LU et al., 2019); cascas de banana (COSTA et al., 2018), pomace de uva (COELHO et al., 2018); farelo de arroz desengordurado (ANGKURATIPAKORN et al., 2017), casca de maracujá (WIJAYA et al., 2017); conchas de sementes de ginkgo (NI et al., 2020), sementes de limão (DAI et al., 2021) e conchas de pistache (KASIRI et al., 2018). Por outro lado, nanoceluloses podem ser mais facilmente obtidos a partir de certas espécies bacterianas (LI et al., 2019; ZHAI et al., 2018; JIA et al. 2016). A celulose bacteriana compartilha a mesma fórmula molecular com as celuloses vegetais, no entanto é livre de lignina, hemiceluloses e pectina, o que torna a sua purificação um processo fácil e de baixa energia, enquanto a purificação de celuloses vegetais geralmente requer processos químicos severos ou moderados (AZEREDO et al., 2019; HUANG et al., 2014).

As emulsões de Pickering estabilizadas com nanocelulose oferecem vantagens promissoras em aplicações de alimentos. Demonstraram melhorar a estabilidade de compostos bioativos encapsulados e controlar a liberação para maior biodisponibilidade (GAO et al., 2023; NGWABEBHOH et al., 2018; SOUZA et al., 2021). Filmes funcionais de embalagens de alimentos formados com emulsões de Pickering estabilizadas por nanocelulose apresentaram resistência mecânica, propriedade de barreira à umidade, atividades antioxidantes e propriedades antimicrobianas (ROY et al., 2021; SOUZA et al., 2021 FOO et al., 2022). Além disso, a barreira física gerada pela adsorção irreversível da nanocelulose na interface óleo-água pode retardar a digestão de lipídios para promover a redução da obesidade (DELOID et al., 2018). A nanocelulose também forneceu excelentes propriedades reológicas das emulsões de Pickering para impressão 3D (MA et al., 2022). Nanocelulose pode ainda ser útil para atuar como um agente estabilizador em produtos de carne com diferentes níveis de gordura ou óleo pré-emulsionado. A adição de nanoceluloses melhorou as propriedades de ligação à água e ligação ao óleo, comportamento reológico e textura, devido ao desenvolvimento de matrizes com microestruturas coesas e homogêneas (MARCHETTI et al., 2021).

À medida que a pesquisa avança nas aplicações da nanocelulose em alimentos, as potenciais questões de segurança das emulsões de Pickering à base de nanocelulose também têm sido estudadas. Estudos de várias linhas celulares e modelos animais exibiram

citotoxicidade e genotoxicidade limitadas (BHATTACHARYA et al., 2017; VARTIAINEN et al., 2011). Pequenas quantidades de nanoceluloses ingeridas adicionadas aos alimentos causaram pouca toxicidade aguda. Além disso, a celulose nanofibrilada ingerida teve poucos efeitos sobre o metaboloma fecal e alterações nos genes de junção das células epiteliais em um experimento de curto prazo conduzido usando um modelo de gavagem em ratos (DELOID et al., 2019; BRAND et al., 2022). No entanto, dada a complexidade dos sistemas de emulsão e produtos alimentares, é importante a realização de estudos específicos caso a caso para abordar possíveis preocupações de segurança relacionadas às emulsões de Pickering à base de nanocelulose. Isso sugere que, embora os achados iniciais sejam promissores, pesquisas detalhadas e complementares são necessárias para garantir a segurança em aplicações alimentares,

3.6 Mecanismo de adsorção interfacial e estabilização das emulsões Pickering

A extensa pesquisa sobre sistemas de emulsões de Pickering estabilizados por nanoceluloses tem gerado grande interesse nos mecanismos de adsorção dessas nanoceluloses nas interfaces óleo-água ou ar-água (SALAS et al., 2014). Finkle, Draper e Hildebrand (1923) foram os primeiros a observar que nanopartículas, capazes de serem umedecidas tanto pela fase aquosa quanto pela fase oleosa, podem formar emulsões de Pickering (FINKLE et al., 1923). As partículas sólidas adsorvidas tendem a se curvar e contrair em direção à fase menos umedecida, determinando assim o tipo de emulsão resultante (óleo em água ou água em óleo) (BON, 2015; CHEVALIER et al., 2013). A molhabilidade e a energia de dessorção (ΔE) das partículas esféricas ou em forma de bastão foram calculadas de acordo com as Equações (1) a (3), respectivamente (BINKS et al., 2016; CARPON et al., 2017; HIROSE et al., 2008).

$$\alpha_{molhabilidade} = \frac{\gamma_{PO} - \gamma_{PA}}{\gamma_{OW}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$\Delta E = \pi r^2 \gamma_{OA} (1 \pm \cos \theta_{OA})^2 \quad (\text{Eq. 3.2})$$

$$\Delta E = lb \gamma_{OA} (1 \pm \cos \theta_{OA}) \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Onde γ_{PO} , γ_{PA} e γ_{OA} são as tensões superficiais das interfaces partícula-óleo, partícula-água e óleo-água, respectivamente. θ_{OA} é o ângulo de contato trifásico da partícula sólida com as fases de óleo e água, r é o raio da partícula, e γ_{OA} é a tensão interfacial óleo-água

pura; l e b são o comprimento e a largura da partícula em forma de bastão.

Com base no cálculo de ΔE , foram concluídas três qualificações básicas para que as partículas sólidas possam estabilizar emulsões de Pickering: molhabilidade, absorvibilidade e tamanho da partícula. Na molhabilidade, as partículas sólidas podem ser parcialmente molhadas por ambas as fases óleo e água. Isso indica que as partículas não podem ser dissolvidas nem pela fase aquosa nem pela fase oleosa. Na adsorção, as partículas podem ser eficientemente adsorvidas na interface óleo-água. Quanto ao tamanho, admite-se que as partículas podem ser uma ordem de magnitude menor do que a gota da emulsão de Pickering desejada (TEO et al., 2022; ALBERT et al., 2019; CAPRON et al., 2017; LI et al., 2021).

Normalmente, a energia necessária para que as partículas se desanexem da interface (ΔE) é quase nula quando o ângulo de contato é próximo de 0° ou 180° . Isso significa que as partículas não têm uma forte afinidade por permanecerem na interface óleo-água, resultando em uma menor estabilidade da emulsão. Quando o ângulo de contato está próximo de 90° , a energia necessária para estabilizar as emulsões é mínima, o que torna essas emulsões de Pickering mais estáveis. Isso ocorre porque a energia de desorção (a energia necessária para que as partículas se desanexem da interface) é igual para ambas as fases, o que favorece a estabilidade da emulsão (SCHMITT et al., 2014; LI et al., 2021). Nesse ponto, partículas com um $\theta < 90^\circ$, associado a um comportamento moderadamente hidrofílico, tendem a estabilizar emulsões óleo em água, enquanto as partículas com $\theta > 90^\circ$, moderadamente hidrofóbicas, estão próximas da fase oleosa e estabilizam a emulsão Pickering água em óleo (FINKLE et al., 1923). No entanto, apesar das tendências hidrofílica ou hidrofóbica das partículas, outros fatores influenciam a formação e estabilização de um sistema coloidal.

A escolha do método de emulsificação de microcanais se mostrou eficiente para estabilizar emulsões de óleo em água estabilizadas apenas por nanopartículas de sílica completamente hidrofílica. O aumento da vazão da fase contínua ao longo das saídas dos microcanais impediu a coalescência das gotículas, através da formação de camada espessa de agregados de sílica nas superfícies das gotículas de óleo. As emulsões obtidas pelo método de emulsificação de microcanais se apresentaram estáveis ao longo de vários meses com uma polidispersão do tamanho das gotas de óleo muito reduzida. Em comparação, a camada adsorvida de agregados de sílica preparada com um método de homogeneizador foi mais fina, indicando a ruptura dos agregados durante a homogeneização. (XU et al., 2005).

De acordo com a equação de Young (Eq. (1)), o ângulo de contato trifásico está

diretamente ligado ao óleo usado através das tensões interfaciais (γ_{PO} e γ_{OA}). Consequentemente, a escolha do óleo é um fator significativo, pois a natureza do óleo afeta diretamente o valor de θ . Mesmo que todos os outros parâmetros, como o tipo de partícula, a concentração de partículas, a razão fase aquosa/fase oleosa e o processo de emulsificação sejam mantidos constantes, uma mudança no óleo pode ser significativa para a estabilização da emulsão (ALBERT et al., 2019). Por exemplo, a polaridade do óleo pode induzir mudança no tipo da emulsão formada. Nanopartículas de sílica com molhabilidade intermediária permitiu a estabilização da emulsão óleo em água com óleos não polares (como hidrocarbonetos) e emulsões de água em óleo com óleos polares (tais como ésteres e álcoois). Portanto, nanopartículas de sílica foram encontradas como mais hidrofílicas na presença de óleos não polares e mais hidrofóbica na presença de óleos polares (BINKS et al., 2000). Comportamento semelhante foi obtido usando látex de poliestireno (READ et al., 2004).

A densidade do óleo também é um fator de efeito na estabilidade e formação de emulsões Pickering. Uma pequena diferença na densidade entre as fases óleo e água, implica uma taxa mais lenta de *creaming* (por um fator de até 102) em comparação com gotículas óleo em água do mesmo tamanho médio. Isso significa que propriedades físicas de densidade similares para as fases óleo e água tendem a formar emulsões mais estáveis (DICKINSON et al., 2019). Sistemas de emulsões Pickering estabilizadas por nanocristais extraídos por hidrólise sulfúrica foram estudadas com óleo de diferentes densidades: óleo de laranja (0,84 g/cm³), óleo de milho, óleo de girassol, óleo de linhaça, Miglyol 812N e óleo de peixe (0,92 a 0,95 g/cm³). O tamanho da gota da emulsão preparado com óleo de linhaça foi estatisticamente menor do que as outras emulsões, embora o óleo de linhaça tivesse características derivadas da composição dos triglicerídeos. Esse efeito foi atribuído a menor constituição dos componentes do óleo de linhaça (BAI et al., 2019).

A modulação da carga de superfície também é um fator que pode influenciar a adsorção de partículas na interface da emulsão. A carga de superfície nas partículas pode estar presente naturalmente ou estar associada aos processos de isolamento das partículas, ou adicionada intencionalmente para fornecer propriedades específicas, como acontece na modificação química. Para controlar o tipo de emulsão (óleo em água ou água em óleo, simples ou múltipla) ou o tamanho das gotículas, a molhabilidade das partículas pode ser ajustada também com a modificação de superfície (WONG et al., 2024). A modulação das cargas geralmente acontece nos dois primeiros casos, para favorecer a formação e a estabilidade das

emulsões Pickering. Modificações na concentração de sal ou pH recorrem como moduladores de carga, refletindo em variações no potencial zeta das partículas e em seu ângulo de contato trifásico (TEO et al., 2022). A presença de sal foi determinante para a formação de emulsões estabilizadas apenas por partículas de hidróxidos duplos em camadas carregadas positivamente, e o tamanho da gota de emulsão formada foi ajustado variando a concentração de sal. A adsorção destas partículas na interface óleo-água ocorreu devido à redução do potencial zeta de partículas (YANG et al., 2006). A presença de 50 mM de cloreto de sódio (NaCl) em água também favoreceu a formação de uma emulsão de Pickering com nanocristais extraída por hidrólise sulfúrico, que induz a formação de grupos sulfatos. Nesse caso, o sal diminuiu a densidade de carga sulfato dos cristais, reduzindo a repulsão entre eles, o que facilitou a ancoragem para a cobertura das gotículas de óleo (LI et al., 2018). Nanofibras de celulose bacteriana obtidas por oxidação mediada por TEMPO foram utilizadas para preparar emulsões Pickering óleo em água. A elevada carga atribuída aos grupos carboxilatos adquiridos durante o isolamento das nanofibras (1,16 mmol/g celulose seca) foi reduzida pela adição de NaCl (100 mM), refletindo na redução do potencial zeta. Isso facilitou a adsorção das nanofibras na interface e a formação de uma camada de adsorção de nanopartículas de maior densidade, reduzindo a tensão interfacial no sistema (WU et al., 2021).

A influência do tamanho da partícula na taxa de adsorção na interface também deve desempenhar um papel importante na formação da emulsão de Pickering. Partículas com uma maior razão de aspecto podem formar uma emulsão de Pickering mais estável, devido à sua maior capacidade de molhar tanto as fases contínuas quanto as dispersas (IWASHITA, 2020; WANG et al., 2023). Por esse motivo, o uso de nanocelulose como partículas sólidas para preparar emulsões de Pickering tem atraído um enorme interesse. Por outro lado, quanto maior o tamanho da partícula, maior o tempo de adsorção na interface, resultando em um aumento do tamanho final da gota. A taxa de adsorção deve ser mais rápida do que a taxa de coalescência das gotículas da fase dispersa, porque a coalescência pode ocorrer antes que as partículas possam adsorver na interface (TEO et al., 2022). Portanto, menores partículas podem favorecer a formação das emulsões finas por se adsorverem mais rapidamente na gota de óleo. Isso é consistente com a Eq. (2) na qual, por meio da energia de adsorção, o tamanho influencia a capacidade das partículas de adsorver na interface (ALBERT et al., 2019).

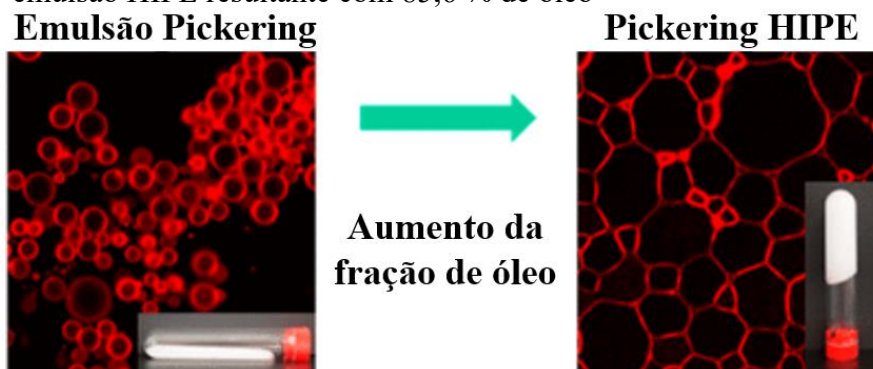
Além do tamanho, a forma e a concentração das partículas mostraram ser fundamentais no comportamento de formação e estabilidade de emulsões Pickering. A

concentração elevada de partículas geralmente garante a formação de gotas estáveis, devido a formação de cobertura de superfície efetiva. As pequenas gotas formadas no processo de emulsificação terão a chance de serem totalmente cobertas e, considerando uma rápida taxa de adsorção, a formação de gotas maiores por coalescência será mínima. Portanto, o tamanho das gotículas tende a diminuir quando a concentração de partículas aumenta (BAI et al., 2019; MIKULCOVÁ et al., 2023). Além disso, no sistema em regime de alta concentração de partícula, a fração não adsorvida nas gotas ficam suspensas na fase aquosa, que atuam como barreira contra coalescência (AVEYARD et al., 2003). Porém, a otimização de formulações estáveis usando uma concentração mínima de partícula é desejável, dispensando o uso de conteúdo emulsificante excedente.

A forma das partículas possui efeito na formação e estabilidade das gotículas. As nanoceluloses em forma de cristais e fibrilas por exemplo, são extensivamente estudadas. Gotículas estabilizadas com nanocristais eram menores do que aquelas estabilizadas com nanofibrilas, devido às diferentes morfologias e tamanhos das partículas de celulose estabilizadora. Os nanocristais são mais curtos em comprimento, cobrem melhor a superfície da gotícula e formam uma monocamada plana na interface óleo-água, facilitando assim a formação de gotículas de emulsão menores. Em comparação, nanofibrilas longas e emaranhadas de nanofibrilas são menos capazes de se adaptar a uma alta curvatura na interface, o que resulta na formação de gotículas maiores (MIKULCOVÁ et al., 2023). Nesse ponto, é importante considerar também a fração de óleo na emulsão. Emulsões contendo frações de óleo mais altas, aumentam a fração de empacotamento das gotículas de óleo e, consequentemente, apresentam uma área hidrodinâmica menor na fase contínua. Assim, uma menor concentração de partículas é capaz de cobrir a área interfacial das gotas (DICKINSON et al., 1997; SUN et al., 2009; CAPRON et al., 2013). Enquanto, em emulsões diluídas (com frações reduzidas <10 %), onde a interação inter gotículas pode ser negligenciada e o processo de *creaming* pode facilmente ocorrer, o mecanismo de estabilidade pode ocorrer por depleção, acima de uma concentração crítica de partícula. Isso foi evidenciado com um comportamento dependente da concentração de nanofibrilas de celulose e nanocristais de celulose combinados para estabilizar emulsões Pickering em frações reduzidas de óleo de girassol (1 % de óleo). Nesse sistema, os nanocristais, por serem menores, adsorveram mais rapidamente nas gotas de óleo e as nanofibrilas atuaram como rede de depleção na fase aquosa (MIKULCOVÁ et al., 2023). Emulsões óleo em água de alta fase interna (HIPEs, fração de volume de fase interna de 74 %)

foram obtidas com frações de óleo 85,6 %, estabilizada com menos de 0,1 % de concentração de nanocristais de algodão. Em uma etapa inicial, gotículas de óleo contendo 10 % foram previamente formadas. Em um segundo estágio a fração de óleo foi aumentada por acréscimo direto às gotículas já estabilizadas com os nanocristais na primeira etapa. A emulsão estável apresentou uma área hidrodinâmica menor na fase contínua, empacotamento das gotículas e deformação da interface, permitindo a cobertura total das gotas de óleo a uma baixa concentração de não cristais. A Figura 3.11 mostra a imagem de microscopia da emulsão Pickering óleo/água inicial, contendo 10 % de óleo e a emulsão resultante HIPE, contendo 85,6 % de óleo (CAPRON et al., 2013).

Figura 3.11 – Microscopia confocal de varredura a laser da emulsão de Pickering óleo em água estabilizada com nanocristais de algodão contendo 10 % de óleo e a emulsão HIPE resultante com 85,6 % de óleo



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Capron et al., 2013.

A compreensão do mecanismo de formação e estabilização das emulsões Pickering ainda apresenta desafios, pois abrange diferentes fatores e variáveis, considerando as potenciais aplicações de cada sistema proposto. A complexidade dos sistemas de emulsão em produtos alimentares exige a realização de estudos específicos caso a caso, iniciando na qualidade da matéria prima (ex. fonte, processamento, toxicidade) até as características requeridas do produto final (físicas, químicas e sensoriais). Produtos como sorvetes ou produtos cárneos, exigem emulsões com características mais viscosas enquanto emulsões mais fluidas são bem aplicadas em bebidas e molhos. Em ambos os casos, é necessário testes de formulação seguido de validação do sistema de emulsão proposto, incluindo estabilidade ao longo do tempo (vida de prateleira).

3.7 Referências

ABDUL KHALIL, H. P. S. *et al.* Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649-665, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>. Acesso em: 23 jul. 2024.

ABOELNAGA, A. *et al.* Microbial cellulose dressing compared with silver sulphadiazine for the treatment of partial thickness burns: A prospective, randomised, clinical trial. **Burns**, v. 44, issue 8, p. 1982-1988, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.06.007>. Acesso em: 25 jan. 2024.

AFKHAMI, A.; MADRAKIAN, T.; AHMADI, M. Nanoscale materials. *In*: **Analytical Nanochemistry**. Amsterdã: Elsevier, p. 3-21, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91741-4.00009-9>. Acesso em: 25 jan. 2024.

AIMONEN, K. *et al.* Surface functionalization and size modulate the formation of reactive oxygen species and genotoxic effects of cellulose nanofibrils. **Part. Fibre. Toxicol.**, v. 16, issue 19, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35296350/>. Acesso em: 25 jan. 2024.

POLOUSE, A. *et al.* Nanocellulose: A Fundamental Material for Science and Technology Applications. **Molecules**, v. 27, issue 22, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27228032>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ÅKERHOLM, M.; HINTERSTOISSER, B.; SALMÉN, L. Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, v. 339, issue 3, p. 569-578, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.11.012>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ALBERT, C. *et al.* Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 309, p. 302-332, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.003>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ALMASHHADANI, A. Q. *et al.* Nanocrystalline cellulose isolation via acid hydrolysis from non-woody biomass: Importance of hydrolysis parameters. **Carbohydrate Polymers**, v. 286, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119285>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ALMEIDA, R. O.; MALONEY, T.; GAMELAS, J. A. Production of functionalized nanocelluloses from different sources using deep eutectic solvents and their applications. **Industrial Crops and Products**, v. 199, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116583>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ALVES, L. *et al.* Rheology of Suspensions of TEMPO-Oxidised and Cationic Cellulose Nanofibrils — The Effect of Chemical Pre-Treatment. **Gels**, v. 10, issue 6, 367, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/gels10060367>. Acesso em: 23 jan. 2024.

DE AMORIM, J. D. P. *et al.* Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environ Chem Lett** 18, p. 851–869, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00989-9>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ANDRADE, F. K. *et al.* Stable microfluidized bacterial cellulose suspension. **Cellulose**, v. 26, p. 5851–5864, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02512-y>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ANGKURATIPALORN, T. *et al.* Fabrication and characterization of rice bran oil-in-water Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 522, p. 310-319, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.03.014>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ANTON-SALES, I. *et al.* Opportunities of Bacterial Cellulose to Treat Epithelial Tissues. **Curr. Drug. Targets.**, v. 20, issue 8, p. 808-822, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389450120666181129092144>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ARANTES, V. *et al.* The current status of the enzyme-mediated isolation and functionalization of nanocelluloses: production, properties, techno-economics, and opportunities. **Cellulose**, v. 27, issue 10, p. 10571-10630, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03332-1>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ARIAS, S. L. *et al.* Fabrication of a Functionalized Magnetic Bacterial Nanocellulose with Iron Oxide Nanoparticles. **J. Vis. Exp.**, v. 26, issue 111, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/52951>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ARMIR, N. A. Z. *et al.* Regenerated Cellulose Products for Agricultural and Their Potential: a review. **Polymers**, v. 13, issue 20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym13203586>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ARSERIM-UÇAR, D. K. *et al.* Characterization of bacterial cellulose nanocrystals: Effect of acid treatments and neutralization. **Food Chemistry**, v. 336, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127597>. Acesso em: 23 jan. 2024.

AVEYARD, R.; BINKS, B.; CLINT, J. H. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100-102, p. 503-546, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00069-6). Acesso em: 23 jan. 2024.

AZEREDO, H. M. C. *et al.* Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>. Acesso em: 23 jan. 2024.

AZEVEDO, M. A. *et al.* Encapsulation of vitamin D3 using rhamnolipids-based nanostructured lipid carriers. **Food Chemistry**, v. 427, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136654>. Acesso em: 23 jan. 2024.

AZEVEDO, M. A. B. **Diferentes processos de branqueamento da celulose e seus efeitos nas propriedades físicas e cristalinidade**. 181f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Belo Horizonte, 2011. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SFSA-95JVPB/1/tese_marco_vs_final.pdf. Acesso em: 23 jan. 2024.

AZMI, S. N. N. S. *et al.* The production and characterization of bacterial cellulose pellicles obtained from oil palm frond juice and their conversion to nanofibrillated cellulose. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 5, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100327>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BABAEI-GHAZVINI, A.; ACHARYA, B. Influence of cellulose nanocrystal aspect ratio on shear force aligned films: Physical and mechanical properties. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100217>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BABAEI-GHAZVINI, A.; ACHARYA, B. The effects of aspect ratio of cellulose nanocrystals on the properties of all CNC films: Tunicate and wood CNCs. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 5, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100311>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BAGHERJERI, M. A. *et al.* Molecular mechanism of cellulose dissolution in N-methyl morpholine-N-oxide: A molecular dynamics simulation study. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121433>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BAI, L. *et al.* Oil-in-water Pickering emulsions via microfluidization with cellulose nanocrystals: 1. Formation and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 699-708, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.038>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BAI, L. *et al.* Recent Innovations in Emulsion Science and Technology for Food Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, p. 8944-8963, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01877>. Acesso em: 23 jan. 2024

BAI, L. *et al.* Recent Advances in Food Emulsions and Engineering Foodstuffs Using Plant-Based Nanocelluloses. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 12, p. 383-406, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-061920-123242>. Acesso em: 23 jan. 2024

BALEA, A. *et al.* Influence of pretreatment and mechanical nanofibrillation energy on properties of nanofibers from Aspen cellulose. **Cellulose**, v. 28, p. 9187-9206, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04109-w>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BARNETTE, A. . *et al.* Selective Detection of Crystalline Cellulose in Plant Cell Walls with

Sum-Frequency-Generation (SFG) Vibration Spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 12, issue 7, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm200518n>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BARUD, H. G. O. *et al.* Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41-51, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.007>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BEJOY, T. *et al.* Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications. **Chemical Reviews**, v. 118, issue 24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00627>. Acesso em: 23 jan. 2024.

GUEVARA-GUERRERO, B. *et al.* Pickering emulsions as encapsulation means of bioactive compounds: review. **Agrifood Sciences**, v. 10, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.23850/24220582.5005>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BENSEFELT, T. *et al.* The Colloidal Properties of Nanocellulose. **ChemSusChem**, v. 16, issue 8, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cssc.202201955>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BHATTACHARYA *et al.* Cytotoxicity screening and cytokine profiling of nineteen nanomaterials enables hazard ranking and grouping based on inflammogenic potential, **Nanotoxicology**, v. 11, p. 809-826, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/17435390.2017.1363309>. Acesso em: 25 jan. 2024.

BINKS, B. P. Particles as surfactants: similarities and differences. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, issue 1-2, p. 21-41, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00008-0). Acesso em: 23 jan. 2024.

BINKS, B. P.; LUMSDON, S. O. Effects of oil type and aqueous phase composition on oil-water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 2, p. 2959-2967, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b002582h>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BINKS, B. P.; YIN, D. Pickering emulsions stabilized by hydrophilic nanoparticles: in situ surface modification by oil. **Soft Matter**, issue 32, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6sm01214k>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BIRDSONG *et al.* Flexible and fire-retardant silica/cellulose aerogel using bacterial cellulose nanofibrils as template material. **Materials Advances**, v. 5, p. 5041-5051, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D3MA01090B>. Acesso em: 25 jan. 2024.

BON, S. A. F. The Phenomenon of Pickering Stabilization: A Basic Introduction. *In*: NGAI, T.; BON, S. A. F. (ed.). **Particle-Stabilized Emulsions and Colloids: Formation and Applications**. Soft Matter Series. United Kingdom: Royal Society of Chemistry, p. 1-7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/9781782620143-00001>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BORDES, R.; VAN DE VEN, T. G. M. Nanocellulose: What used to be cellulose micelles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 29, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.05.004>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BRAGD, P. L.; BEKKUM, H. V.; BESEMER, A. C. TEMPO-Mediated Oxidation of Polysaccharides: Survey of Methods and Applications. **Topics in Catalysis**, v. 27, p. 49-66, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/b:toca.0000013540.69309.46>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BRAND, W. *et al.* Overview of potential adverse health effects of oral exposure to nanocellulose. **Nanotoxicology**, v. 16, issue 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17435390.2022.2069057>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BULKCOTTON. **Mercerization Process**, 2024. Disponível em: <https://bulk cotton.com/industry-glossary/mercerization-process/>. Acesso em: 15 jun. 2024.

CARVALHO, A. P. A.; ÉRTOLA, R.; CONTE-JÚNIOR, C. A. Nanocellulose-based platforms as a multipurpose carrier for drug and bioactive compounds: From active packaging to transdermal and anticancer applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 652, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123851>. Acesso em: 30 nov. 2024.

CAI *et al.* Correlation between interfacial layer properties and physical stability of food emulsions: current trends, challenges, strategies, and further perspectives. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 313, 102863, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102863>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CAPRON, I.; CATHALA, B. Surfactant-Free High Internal Phase Emulsions Stabilized by Cellulose Nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 14, issue 2, p. 291-296, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm301871k>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CAPRON, I.; ROJAS, O. J.; BORDES, R. Behavior of nanocelluloses at interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 29, p. 83-95, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.04.001>. Acesso em: 23 jan. 2024.

SAELICES, C. J.; CAPRON, I. Design of Pickering Micro- and Nanoemulsions Based on the Structural Characteristics of Nanocelluloses. **Biomacromolecules**, v. 19, p. 460-469. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01564>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CARLSSON, D. O. *et al.* Cooxidant-free TEMPO-mediated oxidation of highly crystalline nanocellulose in water. **RSC Advances**, v. 4, issue 94, p. 52289-52298, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c4ra11182f>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CAROLIN, F. C. *et al.* A critical review on sustainable cellulose materials and its multifaceted applications. **Industrial Crops and Products**, v. 203, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117221>. Acesso em: 23 jan. 2024.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. In: CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass: Techniques, Applications and Commercialization**. London: InterOpen, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/53719>. Acesso em: 30 nov.

2024.

VANDERFLEET, O. M.; CASTRIN E. D. Production routes to tailor the performance of cellulose nanocrystals. **Nature Reviews Materials**, v. 6, p. 124-144, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00239-y>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CHASSAING B. *et al.*, Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, p. 92-96, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14232>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CHAVAN, Y. V. *et al.* Application of Bacterial Cellulose in the Food Industry. *In*: KUMAR, V. *et al.* **Bacterial Cellulose: production, scale-up and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781003355434>. Acesso em: 30 nov. 2024.

CHENG, K.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. **Cellulose**, v. 16, p. 1033-1045, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9346-5>. Acesso em: 30 nov. 2024.

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, v. 439, p. 23-34, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054>. Acesso em: 30 nov. 2024.

ZHONG, C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>. Acesso em: 30 nov. 2024.

COCINERO, E. J. *et al.* The building blocks of cellulose: the intrinsic conformational structures os cellobiose, its epimer, lactose and their singly hydrated complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, p. 11117-11123, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja903322w>. Acesso em: 30 nov. 2024.

COELHO, C. C. S. *et al.* Cellulose nanocrystals from grape pomace: Production, properties and cytotoxicity assessment. **Carbohydrates Polymers**, v. 192, p. 327-336, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.023>. Acesso em: 30 nov. 2024.

COSTA, A. L. R. *et al.* Cellulose nanofibers from banana peels as a Pickering emulsifier: High-energy emulsification processes. **Carbohydrates Polymers**, v. 194, p. 122-131, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.001>. Acesso em: 30 nov. 2024.

COX, S. *et al.*, Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. **Nutrition Reviews**, v. 19, p. 726-741, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa038>. Acesso em: 30 nov. 2024.

CUI, F. *et al.* Polysaccharide-based Pickering emulsions: Formation, stabilization and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 119, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106812>. Acesso em: 30 nov. 2024.

D'ALMEIDA, M. L. O. (Coord.) Celulose e papel, Volume I: Tecnologia de fabricação de pasta celulósica, 2. ed. São Paulo: SENAI e IPT, 1988

DAI, H. *et al.* Co-stabilization and properties regulation of Pickering emulsions by cellulose nanocrystals and nanofibrils from lemon seeds. **Food Hydrocolloids**, v. 120, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106884>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DAYAL, M. S.; CATCHMARK, J. M. Mechanical and structural property analysis of bacterial cellulose composites. **Carbohydrates Polymers**, v. 144, p. 447-453, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.055>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DELOID, G. M. *et al.* Reducing Intestinal Digestion and Absorption of Fat Using a Nature-Derived Biopolymer: Interference of Triglyceride Hydrolysis by Nanocellulose. **ACS Nano**, v. 12, issue 7, p. 6469-6479, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03074>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DELOID, G. M. *et al.* Toxicological effects of ingested nanocellulose in *in vitro* intestinal epithelium and *in vivo* rat models. **Environmental Science: Nano**, v. 6, issue 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9en00184k>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DICKINSON, E.; GOLDING, M. Rheology of Sodium Caseinate Stabilized Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 191, issue 1, p. 166-176, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.4939>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DICKINSON, E. Particle-based stabilization of water-in-water emulsions containing mixed biopolymers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 31-40, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.004>. Acesso em: 30 nov. 2024.

KARGARZADEH, H. *et al.* Effects of hydrolysis conditions on the morphology, crystallinity, and thermal stability of cellulose nanocrystals extracted from kenaf bast fibers. **Cellulose**, v. 19, p. 855-866, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9684-6>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DUFRESNE, A.; HUANG, J.; LIN, N. **Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials**. 1. ed., v. 1. Wiley-VCH, 2019.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Surface chemistry, morphological analysis and properties of cellulose nanocrystals with gradiented sulfation degrees. *Nanoscale*, v. 6, issue 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3nr06761k>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DUFRESNE, A. Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 29, p. 1-8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.01.004>. Acesso em: 23 jan. 2024.

DUNLOP, M. J. *et al.* Polylactic Acid Cellulose Nanocomposite Films Comprised of Wood and Tunicate CNCs Modified with Tannic Acid and Octadecylamine. **Polymers**, v. 13, issue 21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym13213661>. Acesso em: 23 jan. 2024.

DUPONT, H. *et al.* New Insights into the Formulation and Polymerization of Pickering Emulsions Stabilized by Natural Organic Particles. **Macromolecules**, v. 54, p. 4945–4970, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.1c00225>. Acesso em: 23 jan. 2024.

MARKETS AND MARKETS. Emulsifiers market by source (bio-based, synthetic), application (food, cosmetics & personal care, oilfield chemicals, pharmaceutical, agrochemicals) and region (North America, APAC, Europe, Middle East & Africa, South America). Global Forecast to 2027. Market Research Report n.º 4612, 2023. Disponível em: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/emulsifier-market-240653061.html?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw28W2BhC7ARIsAPerrcK0cNVM1HMQoTaYTFJF30qYRn0NSEfU-cfEynRV_J8vDoWonqDohAaAs27EALw_wcB. Acesso em: 30 nov. 2024.

ESPINOZA, E. *et al.* Production of lignocellulose nanofibers from wheat straw by different fibrillation methods. Comparison of its viability in cardboard recycling process. **Journal of Cleaner Production**, v. 239, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118083>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FALL, A. B. *et al.* Colloidal Stability of Aqueous Nanofibrillated Cellulose Dispersions. **Langmuir**, v. 27, issue 18, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la201947x>. Acesso em: 30 nov. 2024.

EFSA - European Food Safety Authority. **Biotech routes to obtain bio-based chemicals/materials replacing animal-derived ones**. 24 apr. 2024. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/funding-calls/biotech-routes-obtain-bio-based-chemicals-materials-replacing-animal-derived-ones>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FARIA-TISCHER, P. C. S. *et al.* Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 51, p. 167-173, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.025>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FERNANDES, A. *et al.* Nanotechnology Applied to Cellulosic Materials. **Materials**, v. 16, issue 8, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma16083104>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FINKLE, P.; DRAPER, H. D.; HILDEBRAND, J. H. The theory of emulsification. **Journal of the American Chemical Society**, v. 45, issue 12, 1923. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja01665a002>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FOO, M. L. *et al.* Preparation of black cumin seed oil Pickering nanoemulsion with enhanced stability and antioxidant potential using nanocrystalline cellulose from oil palm empty fruit bunch. **Chemosphere**, v. 287, part 2, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132108>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FOOD CHAIN MAGAZINE. **The Future of Clean Label Ingredients in Food Production**. Norfolk, 2024. Disponível em: <https://foodchainmagazine.com/news/the-future-of-clean-label-ingredients-in-food-production/>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FOSTER, E. J. *et al.* Current characterization methods for cellulose nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 47, issue 8, p. 2609-2679, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6cs00895j>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FRANCISCO, C. R. L. *et al.* Plant proteins at low concentrations as natural emulsifiers for an effective orange essential oil microencapsulation by spray drying. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 607, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125470>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FRASCHINI, C. *et al.* Critical discussion of light scattering and microscopy techniques for CNC particle sizing. **Nordic Pulp & Paper Research Journal**, v. 29, n. 1, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3183/npprj-2014-29-01-p031-040>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GAMA, F. M. P.; DOURADO, F. Bacterial NanoCellulose: what future?. **Bioimpacts**, v. 8, issue 1, p. 1-3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.15171/bi.2018.01>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GAMELAS, J. A. F. *et al.* On the morphology of cellulose nanofibrils obtained by TEMPO-mediated oxidation and mechanical treatment. **Micron**, v. 72, p. 28-33, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.02.003>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GAO, C. *et al.* Preparation and characterization of bacterial cellulose sponge with hierarchical pore structure as tissue engineering scaffold. **Journal of Porous Materials**, v. 18, p. 139-145, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10934-010-9364-6>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GAO, J. *et al.* Pomelo peel derived nanocellulose as Pickering stabilizers: Fabrication of Pickering emulsions and their potential as sustained-release delivery systems for lycopene. **Food Chemistry**, v. 415, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135742>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GARAVAND, F. *et al.* Recent advances in qualitative and quantitative characterization of nanocellulose-reinforced nanocomposites: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 318, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102961>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GEA, S. *et al.* Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, issue 19, p. 9105-9110, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.077>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GIRARD, V.; CHAUSSÉ, J.; VERMETTE, P. Bacterial cellulose: a comprehensive review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 141, issue 15, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.55163>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GOI, Y. *et al.* Dual Functions of TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers in Oil-in-Water Emulsions: A Pickering Emulsifier and a Unique Dispersion Stabilizer. **Langmuir**, v. 35, issue 33, p. 10920-10926, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01977>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GORGIEVA, S.; TRCEK, J. Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. **Nanomaterials (Basel)**, v. 9, issue 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano9101352>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GRANATO, D.; ZABETAKIS, I.; KOIDIS, A. Sustainability, nutrition, and scientific advances of functional foods under the new EU and global legislation initiatives. **Journal of Functional Foods**, v. 109, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105793>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GROMOVYKH, T. I. *et al.* Bacterial cellulose synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* for medical applications. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 53, p. 60-67, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0003683817010094>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GU, J.; CATCHMARK, J. M. C. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, issue 2, p. 547-557, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.040>. Acesso em: 30 nov. 2023.

GU, Y.; SOMERVILLE, C. Cellulose synthase interacting protein: a new factor in cellulose synthesis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, issue 12, p. 1571-1574, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/psb.5.12.13621>. Acesso em: 30 nov. 2023.

GUMUS, E. C.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and Stability of ω -3 Oil Emulsion-Based Delivery Systems Using Plant Proteins as Emulsifiers: Lentil, Pea, and Faba Bean Proteins. **Food Biophysics**, v. 12, p. 186-197, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9475-6>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HABIBI, Y. Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. **Chemical Society Reviews**, v. 43, issue 5, p. 1519-1542, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3cs60204d>. Acesso em: 30 nov. 2023.

AHREM, H. *et al.* Laser-structured bacterial nanocellulose hydrogels support ingrowth and differentiation of chondrocytes and show potential as cartilage implants. **Acta Biomaterialia**, v. 10, issue 3, p. 1341-1353, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.004>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HE, K. *et al.* Water-insoluble dietary fibers from bamboo shoot used as plant food particles for the stabilization of O/W Pickering emulsion. **Food Chemistry**, v. 310, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125925>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HEDJAZI, S.; RAZAVI, S. H. A comparison of Canthaxanthine Pickering emulsions, stabilized with cellulose nanocrystals of different origins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 489-497, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.030>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HERNÁNDEZ, V. A. An overview of surface forces and the DLVO theory. **ChemTexts**, v. 9, n. 10, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40828-023-00182-9>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HIROSE, Y.; KOMURA, S.; KATO, T. Adsorption Dynamics in Pickering Emulsions. **Progress of Theoretical Physics Supplement**, v. 175, p. 81–92, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1143/PTPS.175.81>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HORMAIZTEGUI, M. E. V. *et al.* Nanocelluloses Reinforced Bio-Waterborne Polyurethane. **Polymers**, v. 13, issue 17, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym13172853>. Acesso em: 30 nov. 2023

HOTALING, N. *et al.* DiameterJ: A validated open source nanofiber diameter measurement tool. **Biomaterials**, v. 61, p. 327-338, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.015>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HU, X. *et al.* Effects of Microfluidization Treatment and Transglutaminase Cross-Linking on Physicochemical, Functional, and Conformational Properties of Peanut Protein Isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, issue 16, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf201781z>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HUANG, Y. *et al.* Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, p. 1-30, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HUANG, S. *et al.* Correlation between crystalline cellulose structure and cellulose synthase complex shape: a spectroscopic study with unicellular freshwater alga *Micrasterias*. **Cellulose**, v. 27, p. 57-69, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02793-3>. Acesso em: 30 nov. 2023.

ZHENG, Y. *et al.* Extraction and preparation of cellulose nanocrystal from Brewer's spent grain and application in Pickering emulsions. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 31, p. 100418. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2024.100418>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HUBBE, M. *et al.* Nanocellulose in Thin Films, Coatings, and Plies for Packaging Applications: a Review. **BioResources**, v. 12, issue 1, p. 2143-2233, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.15376/BIORES.12.1.2143-2233>. Acesso em: 30 nov. 2023.

ISOGAI, A.; BERGSTRÖM, L. Preparation of cellulose nanofibers using green and sustainable chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 12, p. 15-21, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.04.008>. Acesso em: 30 nov. 2023.

IVANOVA, L. A. *et al.* Crystal and Supramolecular Structure of Bacterial Cellulose Hydrolyzed by Cellobiohydrolase from *Scytalidium Candidum* 3C: A Basis for Development of Biodegradable Wound Dressings. **Materials**, v. 13, issue, 9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma13092087>. Acesso em: 30 nov. 2023.

IWASHITA, Y. Pickering–Ramsden emulsions stabilized with chemically and morphologically anisotropic particles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 49, p. 94-106, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.05.004>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JALAK, J. **Dissecting the Mechanism of Enzymatic Degradation of Cellulose Using Low Molecular Weight Model Substrates**. 82f. Thesis (Doctor of Philosophy in Gene Technology) - University of Tartu, 2017. Disponível em: <https://dspace.ut.ee/server/api/core/bitstreams/b24edc2b-dce3-4a62-8361-630fa2b29d4f/content>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JANČIČ, U. *et al.* Bacterial nanocellulose loaded with bromelain and nisin as a promising bioactive material for wound debridement. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 266, part. 2, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131329>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JARDIN, J. M. *et al.* Reinforcement of rubber nanocomposite thin sheets by percolation of pristine cellulose nanocrystals. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 428-436, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.303>. Acesso em: 30 nov. 2023.

Jl, C.; WANG, Y. Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions: Fabrication, stabilization, and food applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 318, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102970>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JIA, Y. *et al.* Surfactant-free emulsions stabilized by tempo-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 907-915, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.099>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JIANG, Y. *et al.* Effects of sodium alginate on microstructural and properties of bacterial cellulose nanocrystal stabilized emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 607, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125474>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JIAO, Y. *et al.* Enhancing the Formation and Stability of Oil-In-Water Emulsions Prepared by Microchannels Using Mixed Protein Emulsifiers. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.822053>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Gluten Hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, issue 12, p. 2623-2630,

2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf5001343>. Acesso em: 30 nov. 2023.

ZHANG, K. *et al.* Modulating *in vitro* gastrointestinal digestion of nanocellulose-stabilized Pickering emulsions by altering particle surface charge. **Food Chemistry**, v. 434, p. 137521, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137521>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KALASHNIKOVA, I. *et al.* New Pickering Emulsions Stabilized by Bacterial Cellulose Nanocrystals. **Langmuir**, v. 27, p. 7441-7479. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la200971f>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KALIA, S. *et al.* Nanofibrillated cellulose: surface modification and potential applications. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, p. 5-31, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00396-013-3112-9>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KARANDE, V. S. *et al.* Nanofibrillation of cotton fibers by disc refiner and its characterization. **Fibers and Polymers**, v. 12, p. 229-404, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12221-011-0399-3>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KARGARZADEH, H. *et al.* Methods for Extraction of Nanocellulose from Various Sources. In: KARGARZADEH, H. *et al.* (ed.). **Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites**. Weinheim: Wiley-VCH, p. 1-49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527689972.ch1>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 1008-1018, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KASHCHEYEVA, E. I. *et al.* A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 26, p. 2255-2265, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-02242-7>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KASIRI, N.; FATHI, M. Production of cellulose nanocrystals from pistachio shells and their application for stabilizing Pickering emulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1023-1031, 2018. Disponível em: [10.1016/j.ijbiomac.2017.08.112](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.112). Acesso em: 30 nov. 2023.

KHAN, A. *et al.* Cellulosic Nanomaterials in Food and Nutraceutical Applications: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, issue 1, p. 8-19, 2018. Disponível em: [10.1021/acs.jafc.7b04204](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04204). Acesso em: 30 nov. 2023.

KIERULF, A. *et al.* Protein content of amaranth and quinoa starch plays a key role in their ability as Pickering emulsifiers. **Food Chemistry**, v. 315, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126246>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KIM, H. J. *et al.* Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize lipase.

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 122, p. 170-178, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.007>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KLJUN, A. *et al.* Comparative Analysis of Crystallinity Changes in Cellulose I Polymers Using ATR-FTIR, X-ray Diffraction, and Carbohydrate-Binding Module Probes. **Biomacromolecules**, v. 12, issue 11, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm201176m>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KONG, Y.; HAY, J. N. The measurement of the crystallinity of polymers by DSC. **Polymer**, v. 43, issue 14, p. 3873-3878, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00235-5). Acesso em: 30 nov. 2023.

KOOCHEKI, A. *et al.* Influence of Alyssum homolocarpum seed gum on the stability and flow properties of O/W emulsion prepared by high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 23, issue 8, p. 2416-2424, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.021>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KOROLOVYCH, V. F. *et al.* Cellulose nanocrystals with different morphologies and chiral properties. **Polymer**, v. 145, p. 334,347, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.04.064>. Acesso em: 30 nov. 2023.

DAICHO, K. *et al.* The Crystallinity of Nanocellulose: Dispersion-Induced Disordering of the Grain Boundary in Biologically Structured Cellulose. **ACS Applied Nano Materials**, v. 10, p. 5774–5785, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b01438>. Acesso em: 27 nov. 2023.

LAGERWALL, J. P. F. *et al.* Cellulose nanocrystal-based materials: from liquid crystal self-assembly and glass formation to multifunctional thin films. **NPG Asia Materials**, v. 6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/am.2013.69>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MISHNAEVSKY JÚNIOR, L. *et al.* Nanocellulose reinforced polymer composites: Computational analysis of structure-mechanical properties relationships. **Composite Structures**, v. 224, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2019.111024>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, J. *et al.* Homogeneous isolation of nanocelluloses by controlling the shearing force and pressure in microenvironment. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 388-393, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.085>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, X. *et al.* Cellulose nanocrystals (CNCs) with different crystalline allomorph for oil in water Pickering emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, p. 303-310, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.085>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, Y. *et al.* Review of Recent Development on Preparation, Properties, and Applications of Cellulose-Based Functional Materials. **International Journal of Polymer Science**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/8973643>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, Q. *et al.* Cellulose nanofibrils from *Miscanthus floridulus* straw as green particle emulsifier for O/W Pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 97, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105214>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, Q. *et al.* Flexible cellulose nanofibrils as novel Pickering stabilizers: The emulsifying property and packing behavior. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 180-189, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.039>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, X. *et al.* Stabilization of Pickering emulsions with cellulose nanofibers derived from oil palm fruit bunch. **Cellulose**, v. 27, p. 839-851, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02803-4>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, Q. *et al.* Application of Nanocellulose as particle stabilizer in food Pickering emulsion: Scope, Merits and challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 573-583, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.027>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, Z. *et al.* Fabrication and Evaluation of Alginate/Bacterial Cellulose Nanocrystals–Chitosan–Gelatin Composite Scaffolds. **Molecules**, v. 26, issue 16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26165003>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, Z. *et al.* Nanocellulose fractionated from TEMPO-mediated oxidation of cellulose as an energy-free ingredient for stabilizing Pickering emulsion. **Biochemical Engineering Journal**, v. 191, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108795>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LIMA, H. L. S. *et al.* Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 using sisal juice - an agroindustry waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 671-680, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150514>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LIN, K. *et al.* An analysis on the electrophoretic mobility of cellulose nanocrystals as thin cylinders: relaxation and end effect. **RSC Advances**, v. 9, issue 58, p. 34032-34038, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9ra05156b>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LIU, B. *et al.* Liquid-crystalline assembly of spherical cellulose nanocrystals. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, part. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124738>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LOPES, M. S. Colloidal Stability of Cellulose Suspensions. *In*: RASHED, M. N. **Colloids: Types, Preparation and Applications**. London: InterOpen, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.94490>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LU, H. *et al.* Modular and Integrated Systems for Nanoparticle and Microparticle Synthesis: a review. **Biosensors**, v. 10, issue 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios10110165>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LU, Y. *et al.* Pickering emulsion stabilized with fibrous nanocelluloses: Insight into fiber

flexibility-emulsifying capacity relations. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117483>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LUO, H. *et al.* Evolution of morphology of bacterial cellulose scaffolds during early culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 722-728, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.097>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MA, T. *et al.* High internal phase Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals for 3D printing. **Food Hydrocolloids**, v. 125, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107418>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MAITI, S. *et al.* Preparation and characterization of nano-cellulose with new shape from different precursor. **Carbohydrate Polymers**, v. 98. issue 1, p. 562-567, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.029>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MALVERN PANALYTICAL. **Zeta potential**, 2024. Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/zeta-potential>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MANAN, S. *et al.* Bacterial cellulose: Molecular regulation of biosynthesis, supramolecular assembly, and tailored structural and functional properties. **Progress in Materials Science**, v. 129, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2022.100972>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MAO, Y. *et al.* Characterization of Nanocellulose Using Small-Angle Neutron, X-ray, and Dynamic Light Scattering Techniques. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, issue 6, p. 1340-1351, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11425>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARCHETTI, L.; ANDRÉS, S. C. Use of nanocellulose in meat products. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 96-101, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.003>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARIÑO, M. A.; CYPRIANO, D.; TASIC, L. Agroindustry Residues as a Source for Cellulose Nanofibers Production. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 4, p. 878-888, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200239>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARQUES, A. M. *et al.* Lactoferrin as a carrier of iron: Development and physicochemical characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 142, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108772>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARTINS, D. S. R. **Bacterial Cellulose: One Material, Multiple Products**. 2021. 158 f. Doctoral Thesis (Doctorate in Chemical and Biological Engineering) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, 2021.

MARTINS, D. *et al.* Effect of bacterial cellulose on the foaming properties of egg white and soy proteins. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 7, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100517>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARTINS, D. et al., Effect of ionic strength, pH and temperature on the behaviour of re-dispersed BC:CMC - A comparative study with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 135, p. 108163, 2023a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108163>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MCCLEMENTS, D. Reduced-Fat Foods: The Complex Science of Developing Diet-Based Strategies for Tackling Overweight and Obesity. **Advances in Nutrition**, v. 6, issue 3, p. 3385-3585, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/an.114.006999>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MCCLEMENTS, D.; GUMUS, C. E. Natural emulsifiers: Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 234, p. 3-26, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MCCLEMENTS, D. J.; BAI, L.; CHUNG, C. Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 205-236, 2017. Disponível em: [10.1146/annurev-food-030216-030154](https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-030154). Acesso em: 30 nov. 2023.

MELIKOGLU, A. Y.; BILEK, S. E.; CESUR, S. Optimum Alkaline Treatment Parameters for the Extraction of Cellulose and Production of Cellulose Nanocrystals from Apple Pomace. **Carbohydrate Polymers**, v. 215, issue 8, 330-337, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.103>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MENEGUIN, A. B. *et al.* Spray-dried bacterial cellulose nanofibers: A new generation of pharmaceutical excipient intended for intestinal drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 249, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116838>. Acesso em: 30 nov. 2023.

METZGER, C. *et al.* Effect of ultrasonication on the size distribution and stability of cellulose nanocrystals in suspension: an asymmetrical flow field-flow fractionation study. **Cellulose**, v. 28, p. 10221-10238, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04172-3>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MIKULCOVÁ, V. *et al.* On the stabilization of emulsions by cellulose nanocrystals and nanofibrils: Interfacial behavior and synergism. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 675, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.131975>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MILANOVIC, J. *et al.* Stability of TEMPO-oxidized cotton fibers during natural aging. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115587>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MING L. *et al.* Evolution and critical roles of particle properties in Pickering emulsion: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 388, p. 122775, 2023. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122775>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MISHRA, S. *et al.* Biochemistry, Synthesis, and Applications of Bacterial Cellulose: a review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.780409>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MISSOUM, K.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Nanofibrillated Cellulose Surface Modification: a review. **Materials**, v. 5, issue 5, p. 1745-1766, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma6051745>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MIYASHIRO, D.; HAMANO, R.; UMEMURA, K. A Review of Applications Using Mixed Materials of Cellulose, Nanocellulose and Carbon Nanotubes. **Nanomaterials**, v. 10, issue 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano10020186>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MORAIS, J. P. S. *et al.* Sustainable Pickering Emulsions with Nanocellulose: Innovations and Challenges. **Foods**, v. 12, p. 3599. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12193599>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MOUTINHO, L. F. *et al.* Microbial biosurfactants: A broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and techno-economical assessment of rhamnolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 37, issue 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.3093>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MUIRURI, J. K. *et al.* Bacterial cellulose: Recent advances in biosynthesis, functionalization strategies and emerging applications. **European Polymer Journal**, v. 199, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112446>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MÜLLER, D. *et al.* Electrically conducting nanocomposites: preparation and properties of polyaniline (PAni)-coated bacterial cellulose nanofibers (BC). **Cellulose**, v. 19, p. 1645-1654, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9754-9>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**, 2 Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999.

NAGARAJAN, S. *et al.* Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 182-192, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.118>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NAIMI, S. *et al.* Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. **Microbiome**, v. 9, p. 66, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00996-6>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NASCIMENTO, D. M. **Hidrogéis “verdes” reforçados com nanocristais e nanofibrilas de celulose**. 61f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189057/1/Tese-Diego.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NASCIMENTO, D. M. *et al.* Nanocellulose nanocomposite hydrogels: technological and environmental issues. **Green Chemistry**, v. 20, issue 11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8gc00205c>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NASCIMENTO, E. S. *et al.* TEMPO oxidation and high-speed blending as a combined approach to disassemble bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 26, p. 2291–2302, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2208-2>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NASCIMENTO, E. S. *et al.* All-cellulose nanocomposite films based on bacterial cellulose nanofibrils and nanocrystals. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 29, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100715>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NASIR, M. *et al.* Nanocellulose: Preparation methods and applications. *In*: JAWAID, M.; BOUFI, S.; KHALIL, A. **Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications**. Sawston: Woodhead Publishing, p. 261-276, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00011-5>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Production of cellulose nanofibrils: a review of recent advances. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 2-25, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.016>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NGWABEBHOH, F. A.; ERDAGI, S. I.; YILDIZ, U. Pickering emulsions stabilized nanocellulosic-based nanoparticles for coumarin and curcumin nanoencapsulations: In vitro release, anticancer and antimicrobial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 317-328, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.079>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NI, Y.; LI, J.; FAN, L. Production of nanocellulose with different length from ginkgo seed shells and applications for oil in water Pickering emulsions. **Int J Biol Macromol.**, v. 149, p. 617-626, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.263>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NICOLAS, W. J. *et al.* Structure of the Bacterial Cellulose Ribbon and Its Assembly-Guiding Cytoskeleton by Electron Cryotomography. **Journal of Bacteriology**, v. 203, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.00371-20>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NOREMYLIA, M. B.; HASSAN, M. Z.; ISMAIL, Z. Recent advancement in isolation, processing, characterization and applications of emerging nanocellulose: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 206, p. 954-976, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.064>. Acesso em: 03 out. 2023.

OLIVEIRA-ALCÂNTARA, V. A. *et al.* Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. **LWT**, v. 130, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109699>. Acesso em: 30 nov. 2023.

OSONG, S. H.; NORNGREN, S.; ENGSTRAND, P. Processing of wood-based microfibrillated cellulose and nanofibrillated cellulose, and applications relating to papermaking: a review.

Cellulose, v. 23, p. 93-123, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0798-5>. Acesso em: 30 nov. 2023.

OWONUBI, S. J. *et al.* Non-woody Biomass as Sources of Nanocellulose Particles: A Review of Extraction Procedures. **Frontiers in Energy Research**, v. 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.608825>. Acesso em: 30 nov. 2023.

ÖZTÜRK, B. *et al.* Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. **Journal of Food Engineering**, v. 142, p. 57-63, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.015>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PANDEY, A. Pharmaceutical and biomedical applications of cellulose nanofibers: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 2043-2055, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01182-2>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PARK, S. *et al.* Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 3, n. 10, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PARK, D. *et al.* Bacterial cellulose nanofibrils-reinforced composite hydrogels for mechanical compression-responsive on-demand drug release. **Carbohydrate Polymers**, v. 272, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118459>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PATIL, T. V. *et al.* Nanocellulose, a versatile platform: From the delivery of active molecules to tissue engineering applications. **Bioact. Mater.**, v. 9, p. 566-589, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.07.006>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PAXIMADA, P. *et al.* Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 225-232, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.003>. Acesso em: 03 out. 2023.

PAXIMADA, P. *et al.* Effect of rheological and structural properties of bacterial cellulose fibrils and whey protein biocomposites on electrosprayed food-grade particles. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, p. 116319, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116319>. Acesso em: 03 out. 2023.

PENG, Y. *et al.* Influence of drying method on the material properties of nanocellulose I: thermostability and crystallinity. **Cellulose**, v. 20, p. 2379-2392, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0019-z>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PENG, B. *et al.* Cellulose-based materials in wastewater treatment of petroleum industry. **Green Energy & Environment**, v. 5, issue 1, p. 37-49, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.09.003>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PERRIN, L. *et al.* Low-Frequency Ultrasound Effects on Cellulose Nanocrystals for Potential Application in Stabilizing Pickering Emulsions. **Polymers**, v. 15, issue 22, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym15224371>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PHANTHONG, P. *et al.* Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, issue 1, p. 32-43, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.004>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PIGALEVA, M. A. *et al.* A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 147, p. 59-69, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.02.009>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PIRAS, C. C.; FERNANDÉZ-PRIETO, S.; BORGGRAEVE, W. M. Ball milling: a green technology for the preparation and functionalisation of nanocellulose derivatives. **Nanoscale Advances**, v. 1, issue 3, p. 937-947, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8na00238j>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PIROZZI, A. *et al.* O/W Pickering Emulsions Stabilized with Cellulose Nanofibrils Produced through Different Mechanical Treatments. **Food**, v. 10, issue 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10081886>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PITCHER, M. L.; KOSHANI, R.; SHEIKHI, A. Chemical structure–property relationships in nanocelluloses. **Journal of Polymer Science**, v. 62, issue 1, p. 9-31, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pol.20230558>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PORTELA, R. *et al.* Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial Biotechnology**, v. 12, issue 4, p. 586-610, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>. Acesso em: 30 nov. 2023.

POTOČNIK, V.; GORGIEVA, S.; TRČEK, J. From Nature to Lab: Sustainable Bacterial Cellulose Production and Modification with Synthetic Biology. **Polymers**, v. 15, issue 16, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym15163466>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PRADHAN, D.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Emerging technologies for the production of nanocellulose from lignocellulosic biomass. **Carbohydrate Polymers**, v. 285, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119258>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PRASAD, N. *et al.* Gum arabic – A versatile natural gum: A review on production, processing, properties and applications. **Industrial Crops and Products**, v. 187, part A, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115304>. Acesso em: 30 nov. 2023.

QUEIROZ, A. L. P. *et al.* Investigating microcrystalline cellulose crystallinity using Raman spectroscopy. **Cellulose**, v. 28, p. 8971–8985, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04093-1>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, issue 6, p. 2491-2511, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6426-3>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RAWAL, K. *et al.* Oat flour as a novel stabiliser for designing plant-based Pickering emulsion. **Journal of Food Engineering**, v. 340, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111300>. Acesso em: 30 nov. 2023.

READ, E. S. *et al.* Effect of Varying the Oil Phase on the Behavior of pH-Responsive Latex-Based Emulsifiers: Demulsification versus Transitional Phase Inversion. **Langmuir**, v. 20, issue 18, 7422–7429, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la049431b>. Acesso em: 30 nov. 2023.

REID, M. S.; VILLALOBOS, M.; CRANSTON, E. D. Benchmarking Cellulose Nanocrystals: From the Laboratory to Industrial Production. **Langmuir**, v. 33, issue 7, 1583–1598, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03765>. Acesso em: 30 nov. 2023.

REID, M. S. *et al.* Dewatering of Micro- and Nanofibrillated Cellulose for Membrane Production. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 11, issue 46, 16428–16441, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c02871>. Acesso em: 30 nov. 2023.

REINIATI, I.; HRYMAK, A. N.; MARGARITIS, A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, issue 4, p. 510-524, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1189871>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RHODES, J. M. Nutrition and gut health: the impact of specific dietary components – it's not just five-a-day. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 80, p. 9-18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0029665120000026>. Acesso em: 08 jul. 2024.

RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. **Biotechnology Progress**, v. 36, issue 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.3030>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RIBEIRO, A. *et al.* Pickering Emulsions Based in Inorganic Solid Particles: From Product Development to Food Applications. **Molecules**, v. 28, p. 2504, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28062504>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RIBES, D. D. *et al.* Nanofibrillated Cellulose Extracted by Enzymatic Hydrolysis Followed by Mechanical Fibrillation. **Journal of Natural Fibers**, v. 19, issue 14, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15440478.2021.1982826>. Acesso em: 30 nov. 2023.

ROY, S.; RHIM, J. Gelatin/agar-based functional film integrated with Pickering emulsion of clove essential oil stabilized with nanocellulose for active packaging applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 627, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127220>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. *In situ* modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, issue 2, p. 1717-1723, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.007>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RYNGAJŁŁO, M. *et al.* Towards control of cellulose biosynthesis by *Komagataeibacter* using systems-level and strain engineering strategies: current progress and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 6565-6585, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10671-3>. Acesso em: 30 nov. 2023.

ZHANG, S. *et al.* Gastrointestinal Fate and Fatty Acid Release of Pickering Emulsions Stabilized by Mixtures of Plant Protein Microgels + Cellulose Particles: an In Vitro Static Digestion Study. **Food Biophysics**, v. 18, p. 120-132, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11483-022-09756-5>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, issue 2, p. 455-460, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.039>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SAITO, T. *et al.* Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 8, issue 8, p. 2485–2491, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm0703970>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SALAS, C. *et al.* Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, issue 5, p. 383-396, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.10.003>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SALEM, K. S. *et al.* Comparison and assessment of methods for cellulose crystallinity determination. **Chem. Soc. Rev.**, v. 52, issue 18, p. 6417-6446, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d2cs00569g>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SANTAMARIA-ECHART, A. *et al.* New Trends in Natural Emulsifiers and Emulsion Technology for the Food Industry. In: Prieto, M. A.; Otero, P. **Natural Food Additives**. London: InterOpen, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.99892>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SANTOS, C. A. *et al.* Bacterial nanocellulose membranes combined with nisin: a strategy to prevent microbial growth. **Cellulose**, v. 25, p. 6681–6689, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2010-1>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SCHMITT, V.; DESTRIKATS, M.; BACKOV, R. Colloidal particles as liquid dispersion stabilizer: Pickering emulsions and materials thereof. **Comptes Rendus. Physique**, v. 15, n. 8-9, p. 761-774, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2014.09.010>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SCHUERMANS, A. **The Benefits of Natural Ingredients for Industries**. 2 abr. 2024. LinkedIn: Everas's Experts Insights. Disponível em: <https://www.linkedin.com/pulse/benefits-natural-ingredients-industries-everaingredients-o7xbf/?trackingId=azRbK8UVTzWR4y1ApL4yZQ%3D%3D>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SEDDIQLI, H. A. *et al.* Cellulose and its derivatives: towards biomedical application. *Cellulose*, v. 28, p. 1893-1931, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03674-w>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SEPTEVANI, A. A. *et al.* The Effect of Acid Hydrolysis Treatment on the Production of Nanocellulose Based on Oil Palm Empty Fruit Bunches. **Jurnal Kimia Terapan Indonesia**, 2019. Disponível em: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:199068587>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SHI, Z. *et al.* Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539-545, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SILVÉRIO, H. A. *et al.* Mechanical, thermal, and barrier properties of methylcellulose/cellulose nanocrystals nanocomposites. **Polímeros**, v. 24, n. 6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1691>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SINCLAIR, A. *et al.* High-Performance Styrene-Butadiene Rubber Nanocomposites Reinforced by Surface-Modified Cellulose Nanofibers. **ACS Omega**, v. 4, issue 8, p. 13189–13199, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01313>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SINGH, S. *et al.* Recent advances in cellulose nanocrystals-based sensors: a review. **Materials Advances**, v. 5, issue 7, p. 2622-2654, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d3ma00601h>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SINGSA, P.; NARAIN, R.; MANUSPIYA, H. Bacterial Cellulose Nanocrystals (BCNC) Preparation and Characterization from Three Bacterial Cellulose Sources and Development of Functionalized BCNCs as Nucleic Acid Delivery Systems. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, issue 1, p. 209-221, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsanm.7b00105>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRENSE, A. Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. **Polymers**, v. 2, issue 4, p. 728-765, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym2040728>. Acesso em: 30 nov. 2023.

ŠIROKÝ, J. *et al.* Attenuated total reflectance Fourier-transform Infrared spectroscopy analysis of crystallinity changes in lyocell following continuous treatment with sodium hydroxide. **Cellulose**, v. 17, p. 103-115, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9378-x>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SOMMER, A.; STAROSZCZYK, H. Bacterial cellulose vs. bacterial cellulose nanocrystals as

stabilizer agents for O/W Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 145, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109080>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SOUZA, A. G. *et al.* Cinnamon Essential Oil Nanocellulose-Based Pickering Emulsions: Processing Parameters Effect on Their Formation, Stabilization, and Antimicrobial Activity. **Polysaccharides**, v. 2, issue 3, p. 608-625, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030037>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SOUZA, A. G. *et al.* Starch-based films enriched with nanocellulose-stabilized Pickering emulsions containing different essential oils for possible applications in food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100615>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SQUINCA, P. *et al.* The use of enzymes to isolate cellulose nanomaterials: A systematic map review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100212>. Acesso em: 30 nov. 2023.

STEFANO, F. *et al.* An analytical chemistry experiment for charge density quantification of polyelectrolyte polysaccharides by conductometric titration. **Journal of Chemical Education**, v. 89, n. 1, p. 121-124, 2012. Disponível em: <https://air.unimi.it/bitstream/2434/178829/2/Pre-print.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2023.

STELTE, W.; SANADI, A. R. Preparation and Characterization of Cellulose Nanofibers from Two Commercial Hardwood and Softwood Pulps. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, issue 24, p. 11211-11219, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ie9011672>. Acesso em: 30 nov. 2023.

STOCK, S.; KLITZING, R.; RAHIMZADEH, A. Dynamic light scattering for particle characterization subjected to ultrasound: a study on compact particles and acousto-responsive microgels. **Scientific Reports**, v. 14, n. 989, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51404-0>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SUN, C.; GUNASEKARAN, S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 23, issue 1, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.006>. Acesso em: 30 nov. 2023.

TANAKA, R. *et al.* Influence of Flexibility and Dimensions of Nanocelluloses on the Flow Properties of Their Aqueous Dispersions. **Biomacromolecules**, v. 16, issue 7, p. 2127-2131, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00539>. Acesso em: 30 nov. 2023.

TARRÉS, Q. *et al.* Dynamic Light Scattering Plus Scanning Electron Microscopy: Usefulness and Limitations of a Simplified Estimation of Nanocellulose Dimensions. **Nanomaterials**, v. 12, issue 23, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano12234288>. Acesso em: 30 nov. 2023.

TEO, H. L.; WAHAB, R. A. Towards an eco-friendly deconstruction of agro-industrial biomass and preparation of renewable cellulose nanomaterials: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1414-1430, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.076>. Acesso em: 30 nov. 2023.

TEO, S. H. *et al.* Review of Functional Aspects of Nanocellulose-Based Pickering Emulsifier for Non-Toxic Application and Its Colloid Stabilization Mechanism. **Molecules**, v. 27, issue 21, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27217170>. Acesso em: 30 nov. 2023.

THIRUGANASAMBANTHAN, T. *et al.* Emerging Developments on Nanocellulose as Liquid Crystals: A Biomimetic Approach. **Polymers**, v. 14, issue 8, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym14081546>. Acesso em: 30 nov. 2023.

TIONG, A. C. Y. *et al.* Macroalgae-derived regenerated cellulose in the stabilization of oil-in-water Pickering emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 249, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116875>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, issue 3, p. 343-364, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.040>. Acesso em: 30 nov. 2023.

THOMAS, B. B. *et al.* **Method of preparing a papermaking pulp by mercerizing and etherifying in a non-aging condition.** Rayonier Incorporated. US3340139A. 05 nov. 1967. Filed 19 abr. 1966, ser. n. 543.705. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US3340139A/en>. Acesso em: 30 nov. 2023.

TORRES, F. G. *et al.* Bacterial cellulose-based biosensors. **Medical Devices & Sensors**, v. 3, issue 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds3.10102>. Acesso em: 30 nov. 2023.

TRACHE, D. *et al.* Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications. **Frontier in Chemistry**, v. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00392>. Acesso em: 30 nov. 2023.

UEMATSU, Y. Ion adsorption and zeta potential of hydrophobic interfaces. *In*: WANDELT, K.; BUSSETTI, G. Encyclopedia of Solid-Liquid Interfaces. Elsevier, p. 519-529, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85669-0.00086-6>. Acesso em: 30 nov. 2023.

UNESP. **Celulases e suas aplicações.** Mundo Leveduras, 2013. Disponível em: <http://www1.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2013/Celulases.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2023.

UPPAL, N. *et al.* Cellulosic fibres-based epoxy composites: From bioresources to a circular economy. **Industrial Crops and Products**, v. 182, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114895>. Acesso em: 30 nov. 2023.

VANDERFLEET, O. M.; CRANSTON, E. D. Production routes to tailor the performance of cellulose nanocrystals. **Nature Reviews Materials**, v. 6, p. 124-144, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00239-y>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VANDERFLEET, O. M. **Production routes to tune cellulose nanocrystal properties and their performance at high temperatures**. 263f. Thesis (Doctor of Philosophy) - McMaster University, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11375/26368>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VARSHNEY, S.; MISHRA, N.; GUPTA, M. K. Progress in nanocellulose and its polymer based composites: A review on processing, characterization, and applications. **Polymer Composites**, v. 42, issue 8, p. 3660-3686, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pc.26090>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VARTIAINEN, J. *et al.* Health and environmental safety aspects of friction grinding and spray drying of microfibrillated cellulose. **Cellulose**, v. 18, p. 775-786, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9501-7>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VASCONCELOS, N. F. *et al.* Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 425-431, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.090>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VELÁSQUEZ-COCK, J. *et al.* Influence of cellulose nanofibrils on the structural elements of ice cream. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 204-213, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.035>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VIENNOIS, E. *et al.* Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive *E. coli* Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Press*, v. 33, p. 108229, 2020. Disponível em: Acesso em: 22 jan. 2023.

WAHID, F. *et al.* A facile construction of bacterial cellulose/ZnO nanocomposite films and their photocatalytic and antibacterial Properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 132, p. 692-700, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.240>. Acesso em: 15 mar. 2024.

WANG, N.; DING, E.; CHENG, R. Thermal degradation behaviors of spherical cellulose nanocrystals with sulfate groups. **Polymer**, v. 48, issue 12, p. 3486-3493, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.03.062>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WANG, W. *et al.* Preparation of cellulose nanocrystals from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and their applications to palm oil/water Pickering emulsion. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1-8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.052>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WANG, S. *et al.* Physicochemical characterization of high-quality bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter* sp. strain W1 and identification of the associated genes in bacterial cellulose production. **RSC Advances**, v. 7, issue 71, p. 45145-45155, 2017. Disponível em: DOI <https://doi.org/10.1039/c7ra08391b>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WANG, Z. *et al.* The Role of Shearing Energy and Interfacial Gibbs Free Energy in the Emulsification Mechanism of Waxy Crude Oil. **Energies**, v. 10, issue 5, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en10050721>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WANG, X. *et al.* The Crystallinity and Aspect Ratio of Cellulose Nanomaterials Determine Their Pro-Inflammatory and Immune Adjuvant Effects In Vitro and In Vivo. **Nano-Micro-Small**, v. 15, issue 42, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/sml.201901642>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WANG, Y. *et al.* Recent advances in sustainable preparation of cellulose nanocrystals via solid acid hydrolysis: A mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 7, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127353>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WANG, D. *et al.* Fabrication and application of Pickering emulsion stabilized by high pressure homogenization modified longan shell nanofiber. **Journal of Food Engineering**, v. 339, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111264>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WIJAYA, C. J. *et al.* Cellulose nanocrystals from passion fruit peels waste as antibiotic drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 370-376, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.004>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WONG, S. K. *et al.* Transforming the Chemical Functionality of Nanocellulose for Applications in Food Pickering Emulsions: a Critical Review. **Food Reviews International**, v. 40, issue 4, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2212034>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WU, J. *et al.* Acid-free preparation and characterization of kelp (*Laminaria japonica*) nanocelluloses and their application in Pickering emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115999>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WU, Y. *et al.* Effect of surface charge density of bacterial cellulose nanofibrils on the rheology property of O/W Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 120, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106944>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WU, Y. *et al.* Effect of surface charge density of bacterial cellulose nanofibrils on the properties of O/W Pickering emulsions co-stabilized with gelatina. **Food Hydrocolloids**, v. 138, p. 108447, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108447>. Acesso em: 22 jan. 2023.

KAUR, P. Et al. Nanocellulose: Resources, Physio-Chemical Properties, Current Uses and

Future Applications. **Front. Nanotechnol**, v. 3, p. 747329. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.747329>. Acesso em: 22 jan. 2023.

XIE, H. *et al.* Recent Strategies in Preparation of Cellulose Nanocrystals and Cellulose Nanofibrils Derived from Raw Cellulose Materials. **International Journal of Polymer Science**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/7923068>. Acesso em: 22 jan. 2023.

XIONG, X. *et al.* Study on mechanical and electrical properties of cellulose nanofibrils/graphene-modified natural rubber. **Materials Chemistry and Physics**, v. 223, p. 535-541, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.11.041>. Acesso em: 22 jan. 2023.

XU, Q. Y.; NAKAJIMA, M.; BINKS, B. P. Preparation of particle-stabilized oil-in-water emulsions with the microchannel emulsification method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 262, issues 1–3, p. 94-100, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.04.019>. Acesso em: 22 jan. 2023.

XU, K. *et al.* Preparation, Properties, and Advanced Functional Applications of Nanocellulose. In: DU, G.; ZHOU, X. **Wood Industry: past, present and future outlook**. Intechopen, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.105807>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YAMADA Y. Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p. 1670-1672, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.054494-0>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YAN, Z. *et al.* Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, issue 3, p. 659-665, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.028>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YAN., H. *et al.* Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil Pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 127-135, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YAN, H. *et al.* Entrapment of bacterial cellulose nanocrystals stabilized Pickering emulsions droplets in alginate beads for hydrophobic drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 112-120, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.057>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YANG, F. *et al.* Pickering emulsions stabilized solely by layered double hydroxides particles: The effect of salt on emulsion formation and stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 302, issue 1, p. 159-169, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.06.015>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YANG, H.; ALAM, M. N.; VAN DE VEN, T. G. M. Highly charged nanocrystalline cellulose and dicarboxylated cellulose from periodate and chlorite oxidized cellulose fibers. **Cellulose**, v. 20, p. 1865-1875, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9966-7>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YANG, X. *et al.* Effects of preparation methods on the morphology and properties of nanocellulose (NC) extracted from corn husk. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 241-247, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.032>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YANG, M. *et al.* Thermo-sensitive composite microspheres incorporating cellulose nanocrystals for regulated drug release kinetics. *Carbohydrate Polymers*, v. 301, part. B, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120350>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YAO, C. *et al.* Green preparation of cellulose nanofibers via high-pressure homogenization and their film-forming properties. **Industrial Crops and Products**, v. 206, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117575>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YOUNESI, M.; WU, X.; AKKUS, O. Controlled mercerization of bacterial cellulose provides tunability of modulus and ductility over two orders of magnitude. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 90, p. 530-537, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.11.005>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YU, H. *et al.* Facile extraction of thermally stable cellulose nanocrystals with a high yield of 93% through hydrochloric acid hydrolysis under hydrothermal conditions. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 1, issue 12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3ta01150j>. Acesso em: 22 jan. 2023.

LIU, Z. *et al.* Bacterial cellulose nanofibers improved the emulsifying capacity of soy protein isolate as a stabilizer for Pickering high internal-phase emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 112, p. 106279, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106279>. Acesso em 04 abr 2024.

ZHAI, X. *et al.* Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. **Food Research International**, v. 103, p. 12-20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.030>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHANG, H. *et al.* Extraction and comparison of cellulose nanocrystals from lemon (*Citrus limon*) seeds using sulfuric acid hydrolysis and oxidation methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 238, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116180>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHANG, L. *et al.* Greener production of cellulose nanocrystals: An optimised design and life cycle assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 345, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131073>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHANG, X. *et al.* Bacterial Cellulose Nanofibril-Based Pickering Emulsions: Recent Trends

and Applications in the Food Industry. **Foods**, v. 11, issue 24, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11244064>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHAO, Y. *et al.* Cellulose nanofibrils-stabilized food-grade Pickering emulsions: Clarifying surface charge's contribution and advancing stabilization mechanism understanding. **Food Hydrocolloids**, v. 152, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109920>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHONG, C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHOU, L. L. *et al.* Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **J. Ind. Microbiol Biotechnol.**, v. 34, issue 7, p. 483-489, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0218-4>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHU, H *et al.* Characterization of bacteriostatic sausage casing: A composite of bacterial cellulose embedded with ϵ -polylysine. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 1479–1484, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0211-y>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHU, W. *et al.* In-situ biopreparation of biocompatible bacterial cellulose/graphene oxide composites pellets. **Applied Surface Science**, v. 338, p. 22-26, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.02.030>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZIMMERMANN, T.; BORDEANU, N.; STRUB, E. Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, issue 4, p. 1086-1093, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.045>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZULNAZRI, Z. *et al.* Effect of Hydrochloric Acid Hydrolysis under Sonication and Hydrothermal Process to Produce Cellulose Nanocrystals from Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB). **Polymers**, v. 16, issue 13, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym16131866>. Acesso em: 22 jan. 2023.

CAPÍTULO 4: NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA OU NANOFIBRILAS COMO ESTABILIZADORES DE PICKERING EM EMULSÕES DE BAIXO TEOR DE OLEO: UM ESTUDO COMPARATIVO

A celulose, uma fibra insolúvel naturalmente presente em muitos produtos alimentícios, desempenha um papel importante na dieta humana. A celulose bacteriana compartilha os benefícios das outras fibras alimentares insolúveis, e seu potencial como aditivo alimentar tem sido explorado, especialmente por suas propriedades emulsificantes, que auxiliam no espessamento e estabilidade de emulsões Pickering. Estudos avaliaram diversas condições de processamento e formulações para entender melhor o desempenho da nanocelulose em sistemas alimentares. Contudo, ainda faltam investigações sobre o uso de nanoceluloses em emulsões diluídas, com menos de 10 % de óleo, que têm grande potencial em produtos como molhos de baixo teor de gordura e bebidas multifásicas. Esta investigação avaliou o potencial da celulose bacteriana (CB) em duas formas distintas, nanocristais (NCCB) e nanofibrilas oxidadas (CBNF), como estabilizadores para emulsões de baixo óleo em água (1 % v/v). A pesquisa explorou o impacto da força iônica e da concentração de CB nas características físico-químicas, estabilidade e propriedades reológicas dessas emulsões.

Este capítulo foi reproduzido e adaptado com permissão da ELSEVIER © 2024.

Náyra O.F. Pinto, Ana Isabel Bourbon, Daniela Martins, André Pereira, Miguel A. Cerqueira, Lorenzo Pastrana, Miguel Gama, Henriette M.C. Azeredo, Morsyleide F. Rosa, Catarina Gonçalves, Bacterial cellulose nanocrystals or nanofibrils as Pickering stabilizers in low-oil emulsions: A comparative study, Food Hydrocolloids, Volume 157, 110427, ISSN 0268-005X, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110427>.

4.1 Introdução

Na indústria alimentícia, emulsões de óleo em água são geralmente estabilizadas por emulsificantes de grau alimentício, como proteínas, fosfolipídios, surfactantes e polissacarídeos. Esses emulsificantes são adsorvidos na interface óleo-água, protegendo as gotas da emulsão contra a agregação, principalmente por meio da redução da tensão interfacial (CAI et al., 2023).

Os emulsificantes mais utilizados na indústria alimentícia são surfactantes de pequenas moléculas, biopolímeros anfífilos e partículas com atividade superficial (JIANG et al., 2020). Embora os emulsificantes convencionais (ou seja, surfactantes) tenham sido utilizados com sucesso, seu consumo tem atraído atenção em pesquisas nos últimos anos devido a evidências preliminares de efeitos adversos à saúde humana (Chassaing et al., 2015; COX et al., 2021; JIA et al., 2016; JIANG et al., 2020; NAIMI et al., 2021; RHODES, 2021; VIENNOIS et al., 2020). Consequentemente, a ciência das emulsões tem impulsionado o desenvolvimento de novas abordagens para melhorar a qualidade e a funcionalidade dos alimentos (BAI et al., 2021).

Nesse contexto, foram desenvolvidas emulsões revestidas por uma camada de partículas sólidas na interface óleo-água, conhecidas como emulsões de Pickering, que são livres de surfactantes e altamente estáveis (BAI et al., 2021). As emulsões de Pickering geralmente apresentam forte resistência à coalescência devido à adesão quase irreversível de partículas coloidais à superfície das gotas, substituindo os surfactantes (MING et al., 2023; MORAIS et al., 2023). Diferentes partículas sólidas, que apresentam afinidade por ambas as fases (anfifilicidade) resultando em propriedades de molhabilidade adequadas, têm sido utilizadas como estabilizadores em emulsões de Pickering, incluindo tanto nanopartículas inorgânicas quanto orgânicas (FUJISAWA et al., 2017).

Nanomateriais de base biológica, como polissacarídeos, se alinham ao movimento de rótulo limpo, uma demanda que reflete a preocupação dos consumidores em utilizar produtos alimentares mais naturais (BAI et al., 2018; MARUYAMA et al., 2021). A celulose bacteriana é um biopolímero e, embora quimicamente idêntica à celulose vegetal, é naturalmente obtida livre de lignina e hemiceluloses. Embora não seja regulamentada na Europa e nos EUA, a celulose bacteriana é utilizada na indústria alimentícia na Ásia e como material implantável em diversas aplicações médicas, demonstrando sua segurança. No entanto, isso se aplica à celulose

bacteriana, ainda não aos seus nano-derivados (MOTA et al., 2022). Reduzir o tamanho de sua estrutura fibrilar por meio de processos físicos e/ou químicos gera estruturas na forma de nanofibrilas ou nanocristais. Essas nanoceluloses exibem propriedades únicas resultantes de sua estrutura e química de superfície, com grande potencial para estabilizar emulsões alimentares (Azeredo et al., 2019; KOSHANI & MADADLOU, 2018; LIU et al., 2022; MIKULCOVÁ et al., 2023; WONG et al., 2023).

A capacidade das nanoestruturas à base de celulose de se organizarem nas interfaces óleo-água é particularmente útil e tem levado a recentes artigos e patentes nessa área (KEDZIOR et al., 2021). Fatores que afetam a capacidade de estabilizar emulsões óleo-em-água incluem a origem, forma, tamanho das partículas, densidade de carga superficial e concentração de nanocelulose (LOW et al., 2020). Os estudos com nanocelulose têm sido limitados ao uso de frações de óleo superiores a 10 %, com ênfase em emulsões com alta fase interna (HIPEs, fração de volume da fase interna >74 %) (BAGO RODRIGUEZ & BINKS, 2022; HUANG et al., 2024; KALASHNIKOVA et al., 2011; Z. LIU et al., 2021; PAXIMADA et al., 2016; SOMMER & STAROSZCZYK, 2023; WANG et al., 2023; WU et al., 2023; YAN et al., 2017; K. ZHANG et al., 2024; S. ZHANG et al., 2023), o que pode ser considerado uma alta concentração ao considerar aplicações direcionadas a sistemas multifásicos, como bebidas e refrigerantes (BAI et al., 2018), alimentos com baixo teor de gordura (GAO et al., 2023; ZHAO et al., 2023), ou ao buscar minimizar os custos de produção, mantendo as propriedades e funções das emulsões (GUO et al., 2022).

Poucos estudos relatam emulsões de Pickering utilizando nanocelulose com frações de óleo baixas (<10 %), bem como sua aplicação na indústria alimentícia. Guo et al. estudaram a estabilização de emulsões com 1 % de óleo utilizando nanofibrilas de celulose ou nanofibrilas de celulose oxidadas por TEMPO a partir de plantas, bem como a adição sequencial de ambas (GUO et al., 2022). Em um estudo diferente, as sinergias da combinação de nanofibrilas e nanocristais de celulose vegetal foram exploradas para estabilizar emulsões com 1 % de óleo (BAI et al., 2018). As potenciais aplicações das emulsões com baixo teor de óleo na indústria alimentícia incluem molhos e temperos com baixo teor de gordura (FORD KRAFT FOODS et al., 2004).

De fato, emulsões com baixo teor de óleo (HEDAYATI et al., 2020) ou nanoemulsões (MCCLEMENTS, 2012) representam um desafio, pois tendem a se decompor rapidamente e a sofrer separação de fases devido à quantidade reduzida da fase dispersa.

Emulsificantes eficientes e métodos de processamento adequados são necessários para garantir a estabilidade dessas emulsões. Emulsões com alta fração volumétrica da fase oleosa têm sua estabilidade melhorada devido ao aumento na fração de empacotamento das gotas de óleo (DICKINSON & GOLDING, 1997).

A força iônica demonstrou ter um impacto significativo nas características e na estabilidade das emulsões de Pickering (COURTENAY et al., 2021; YAN et al., 2017), pois confere atividade superficial às partículas, tornando-as emulsificantes eficazes ou facilitando sua desagregação da interface quando necessário (ANJALI & BASAVARAJ, 2018). No entanto, não há relatos de tentativas para a produção de emulsões de Pickering com baixo teor de óleo, óleo-em-água, estabilizadas através da modulação da carga pela força iônica. O efeito individual dos nanocristais ou nanofibrilas na formação e estabilidade dessas emulsões ainda não foi explorado. Em resumo, encontrar abordagens eficazes para produzir emulsões de Pickering estáveis usando nanoceluloses bacterianas em sistemas de emulsão com baixa concentração de óleo é particularmente relevante para a síntese de alimentos (MCCLEMENTS, 2015), cosméticos (CHUBERRE et al., 2019; MOHIUDDIN, 2019) e outros materiais sustentáveis (MOUSTAFA et al., 2022).

Neste estudo, foi proposto o uso de nanoceluloses bacterianas (CBNF ou NCCB) como estabilizadores na produção de emulsões de Pickering com baixa concentração de óleo (1 % v/v). Os efeitos da força iônica (até 50 mM de NaCl) e da concentração de nanocelulose (até 1 % m/m) nas propriedades físico-químicas, estabilidade e propriedades reológicas foram avaliados. De acordo com a política da UE, uma alegação de baixo teor de sal pode ser feita para produtos que utilizem concentrações de NaCl inferiores a 51 mM. As concentrações de NaCl testadas neste trabalho estão dentro da faixa de baixo teor de sal da política da UE. Nanocristais e nanofibrilas foram produzidos utilizando diferentes metodologias, resultando em variações na forma, tamanho e carga superficial. Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que compara CBNF e NCCB como emulsificantes naturais no desenvolvimento de emulsões de Pickering com baixa fração de óleo (1 %). Esta pesquisa demonstrou a formação de redes individualizadas de nanocristais ou nanofibrilas como estabilizadores eficazes em sistemas de emulsão com baixa fração de óleo, que podem ser manipulados controlando a concentração de sal ou nanocelulose bacteriana.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Materiais

Membranas purificadas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582, por fermentação em condições estáticas em meio sintético HS (do Nascimento et al., 2019), foram fornecidas pela EMBRAPA Agroindústria Tropical (Brasil). Brometo de potássio (NaBr), hipoclorito de sódio (NaClO), hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) foram obtidos da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) e utilizados sem purificação adicional, conforme recebidos do fornecedor. Saco de diálise, 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil (TEMPO), formvar e ácido fosfotúngstico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (São Paulo, Brasil).

Cloreto de sódio (NaCl) foi comprado da Sigma-Aldrich Co. (Helsinki, Finlândia). Óleo de girassol refinado comercial (3ás, Fula, Grupo Sovena, Algés, Portugal) foi comprado em um supermercado local (Braga, Portugal) e iso-hexadecano foi gentilmente fornecido pela Lanxess (Leverkusen, Alemanha). β -caroteno (Tipo II, sintético, ≥ 95 % (HPLC), cristalino) foi comprado da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Água ultrapura foi utilizada em todos os experimentos (Milli-Q, Darmstadt, Alemanha).

4.2.2 Preparação de nanofibrilas de CB oxidadas (CBNF)

A CB foi oxidada por oxidação mediada por TEMPO e nanofibrilada seguindo o método proposto por Pereira et al. (PEREIRA et al., 2020). A CB foi suspensa em água destilada (10 mg/mL, base seca) contendo TEMPO e NaBr dissolvidos (0,016 g e 0,1 g por grama de CB, respectivamente). A oxidação foi iniciada pela adição de uma solução de NaClO a 11 % (suficiente para alcançar uma concentração de 5 mmol/g de NaClO com base na CB seca) à suspensão a 25 °C sob agitação (500 rpm). O pH foi ajustado para 10–10,5 com uma solução de NaOH a 0,5 mol L⁻¹, e as condições foram mantidas por 150 min. Etanol (95 % v/v) (60 mL por grama de CB) foi adicionado para parar a reação. A CB oxidada foi lavada com água e centrifugada a 26.400×g por 15 min (Hitachi Koki Himac CR22GIII, Japan) até atingir pH ~ 6,5. A suspensão de CBNF foi preparada desintegrando a CB oxidada utilizando um misturador de alta velocidade (Vita-Prep 3, Vitamix Corp., Cleveland, OH, EUA) a 24.000 rpm por 15 min.

O teor sólido da suspensão foi determinado gravimetricamente após secagem a 105 °C até peso constante, e o teor de carboxilato da CBNF foi determinado pelo método de titulação de condutividade elétrica (Digimed, modelo DM-32, São Paulo, Brasil).

4.2.3 Preparação de nanocristais de celulose bacteriana (NCCB)

Os nanocristais de celulose bacteriana (NCCB) foram preparados por hidrólise ácida conduzida a 45 °C por 90 min usando ácido sulfúrico a 60 % (m/m). Polpa de celulose bacteriana (10 g) foi agitada em 200 mL da solução ácida. Ao final do processo, a reação foi interrompida pela adição de água deionizada fria (~4 °C) em uma proporção volumétrica de 1:3 (suspensão/água, v/v). A suspensão foi centrifugada (Hitachi - CR 22GIII) a 26.400×g por 15 min a 20 °C até que o sobrenadante ficasse claro. Os NCCBs resultantes foram lavados em três ciclos com água deionizada e centrifugados a 26.400×g por 15 min a 20 °C. A ultrassonicação (Unique – Cell Disruptor, 60 Hz; 300 W) foi aplicada em cada ciclo por 2 min, com intervalos de 1 min para evitar aglomeração de partículas. Posteriormente, a suspensão coloidal foi dialisada com água destilada por 48 h até atingir um pH de ~ 6,5. A suspensão de NCCB foi uma mistura de três lotes de suspensão, e seu teor sólido foi determinado gravimetricamente após secagem a 105 °C até peso constante.

4.2.4 Caracterização físico-química de nanoceluloses bacterianas

4.2.4.1. Medições de potencial zeta

O potencial zeta da nanocelulose aquosa diluída 100 × em água Milli-Q foi medido usando espalhamento de luz dinâmico (DLS) com um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) a 25 °C, com ajuste de ângulo de detecção de 173°, índice de refração de 1,45, índice de dispersão de 1,33, viscosidade de 0,8872 cP e laser He–Ne (4 nW). A mobilidade eletroforética considerou a constante dielétrica da água de 78,5. O software Zetasizer (versão 7.03) foi utilizado para análise dos dados.

4.2.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise morfológica foi realizada usando um microscópio Tescan Vega 3 SBU (Tesca, República Tcheca), com detector STEM sob uma voltagem de aceleração de 30 kV. Suspensões diluídas $100 \times$ de CBNF ou NCCB foram depositadas em grades individuais cobertas com Formvar, e o excesso da suspensão foi removido com papel absorvente. Após 3 mins, gotas de ácido fosfotúngstico a 1 % (m/v) foram depositadas nas grades e removidas com papel absorvente. Pelo menos 10 campos da amostra foram visualizados. Os diâmetros ou comprimentos médios das nanofibrilas e nanocristais, de pelo menos 100 estruturas, foram determinados usando o software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde-NIH, EUA) (Vasconcelos et al., 2017).

4.2.4.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR de NCCB e CBNF foram registrados no modo de absorção usando um espectrômetro FTIR VERTEX 80v (Bruker, Alemanha) na faixa de comprimento de onda de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} ao longo de 32 varreduras, usando o modo de reflexão total atenuada (ATR) Platinum (Bruker, Alemanha). Os espectros de FTIR foram normalizados entre 0 e 1. As amostras foram congeladas ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e, em seguida, liofilizadas ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) sob $1,09\text{ Pa}$ por 48 h e armazenadas até posterior caracterização.

4.2.4.4. Ângulo de contato e tensão interfacial

O ângulo de contato e a tensão interfacial das suspensões de CBNF ou NCCB foram determinados por um dispositivo de medição de ângulo de contato dinâmico (OCA 20, DataPhysics) e módulo de software SCA 20 (DataPhysics).

Para medir o ângulo de contato, três camadas sobrepostas ($\sim 100\text{ }\mu\text{L}$ cada) de suspensões de CBNF ou NCCB (1 %) foram secas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em lâminas de vidro para obter filmes planos e uniformes. Usando uma seringa Hamilton de $500\text{ }\mu\text{L}$, uma gota de $2\text{ }\mu\text{L}$ de água duplamente destilada foi depositada nas superfícies dos filmes com um injetor de alta precisão. O contato da água com os filmes foi registrado com um tempo de contato de 120 s a $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dez medições foram feitas para cada material.

A tensão interfacial em função da dosagem de CBNF (0,5 %, 1 %) ou NCCB (0,5 %, 1 %) foi medida pelo método da gota pendente (MARTINS et al., 2020a). Óleo de girassol ou

iso-hexadecano (2 mL) foi adicionado a uma cubeta fluorescente padrão descartável de poliestireno óptico macro (1 cm × 1 cm × 4,5 cm) (Labbox). Uma gota pendente das suspensões foi formada usando uma seringa descartável de 1 mL com uma agulha de 0,71 mm de diâmetro externo, imersa na fase oleosa, sempre na mesma profundidade. O volume máximo das gotas foi determinado previamente para cada amostra. O valor da tensão interfacial foi calculado automaticamente, 10 vezes por min até 25 leituras, em triplicata para cada amostra e a 20 ± 1 °C.

4.2.5. Preparação de emulsões Pickering de óleo em água

Emulsões com baixa fração de óleo de girassol (1 % v/v) foram preparadas misturando CBNF ou NCCB (0,5–1 % v/v) com ou sem NaCl (até 50 mM), em triplicata. Após a combinação dos componentes, a mistura foi imediatamente emulsificada usando um misturador de alta força de cisalhamento (IKA Ultra - Turrax T-18 digital) a 20.000 rpm por 4 min e, em seguida, sonificada (Sonifier 450, Branson Ultrasonics, Danbury, CT) em banho de gelo por 4 min, com tempo de 30 s ligado/desligado e 50 % de amplitude para cada emulsão. Isso corresponde a uma densidade de potência de aproximadamente 20.000 W.L⁻¹ de emulsão. Todas as emulsões foram analisadas para determinar o tamanho médio das gotas e a morfologia. A estabilidade das emulsões também foi avaliada por inspeção visual, considerando que a ausência de óleo ou formação de creme na superfície da emulsão indica estabilidade da emulsão.

4.2.6 Caracterização físico-químicas das emulsões Pickering

4.2.6.1 Tamanho das gotas - microscopia óptica

As imagens das emulsões foram capturadas com um microscópio óptico Wide-Field Upright Fluorescence Microscope – Nikon – Ni-E equipado com uma câmera Nikon DS-Fi2 (Nikon, Japão) dentro de 180 min após a preparação da emulsão. Uma gota da emulsão foi pipetada em uma lâmina de vidro e suavemente espalhada na lâmina usando a ponta da pipeta. O uso de lamínulas foi evitado e aplicado apenas quando necessário para aquisição de imagens. As amostras foram estudadas em ampliações de 5 ×, 20 × e 50 ×. O tamanho das partículas das emulsões foi medido a partir das imagens com ampliação de 50 × e analisado utilizando o

software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde-NIH, EUA). De acordo com a teoria de Mie, as medições do tamanho das partículas foram relatadas como o diâmetro médio ponderado por área $D_{(3,2)}$ e calculadas conforme Eq. (4.1) (WU et al., 2022).

$$D_{(3,2)} = \frac{\sum n_i \times d_i^3}{\sum n_i \times d_i^2} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

onde n é o número de partículas com o diâmetro.

4.2.6.2 Estabilidade

4.2.6.2.1 Estabilidade à temperatura ambiente

O efeito da concentração de CBNF ou NCCB (0,5–1 % m/m) e da força iônica (0, 12,5 e 50 mM de NaCl) foi avaliado na estabilidade de emulsões recém-preparadas ou após 30 dias de armazenamento. As emulsões foram armazenadas em tubos de ensaio à temperatura ambiente e seladas com papel alumínio para evitar a evaporação da água. A estabilidade foi avaliada por inspeção visual da emulsão e por microscopia óptica.

4.2.6.2.2 Estabilidade acelerada

A estabilidade acelerada em relação às forças centrífugas também foi avaliada submetendo as emulsões à centrifugação de acordo com Gestranus et al. (GESTRANIUS et al., 2017). 30 min após a preparação, as emulsões (1 mL) foram centrifugadas (Centrífuga 5810, Eppendorf, Alemanha) por 2 min a 1520 g. As emulsões foram inspecionadas visualmente (coalescência e formação de creme forçada) e por microscopia óptica.

4.2.6.3 Cryo-SEM

As observações por Cryo-SEM foram realizadas usando um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (JEOL JSM 6301 F) com microanálise de raios X (Oxford INCA Energy 350) e instalações experimentais Cryo-SEM (Gatan Alto 2500). Cada amostra foi

rapidamente resfriada em nitrogênio líquido e transferida, sob vácuo, para a câmara fria da câmara de preparação. O espécime foi fraturado, sublimado por 120 s a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ e revestido com Au/Pd por sputtering durante 50 s com uma corrente de 12 mA. A amostra foi então transferida para a câmara de SEM e observada a uma temperatura de $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MARTINS et al., 2020a).

4.2.6.4 Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)

Para observar as fases aquosa e oleosa, uma emulsão óleo-em-água estabilizada por NCCB foi preparada utilizando óleo de girassol (10 % v/v) incorporando beta-caroteno (0,05 % m/v) e estabilizada por NCCB (1 % v/v) contendo 50 mM de NaCl. Um microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 780, Alemanha) foi utilizado para investigar a adsorção efetiva das partículas de celulose bacteriana na interface óleo-água.

Brevemente, 100 μL de emulsão foi incubado com 10 μL de CalcoFluor White (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) por 15 min para corar a celulose. O CalcoFluor foi observado com um comprimento de onda de excitação de 405 nm. A fluorescência natural do beta-caroteno na fase oleosa foi visualizada com um comprimento de onda de excitação de 488 nm. A resolução óptica das imagens digitais foi de 512 pixels $\times$ 512 pixels. As imagens foram registradas e processadas digitalmente usando o software do equipamento (Software Zen 2010 e imagem).

4.2.6.5 Reologia

As curvas de fluxo foram obtidas utilizando um Reômetro Híbrido Discovery (DHR1) da TA Instruments (New Castle, EUA) com a temperatura Peltier ajustada para $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. O software TRIOS (New Castle, Reino Unido) foi utilizado para controlar o equipamento e adquirir os parâmetros reológicos. Uma geometria cone-placa de aço inoxidável de 60 mm, com um ângulo de $2,006^{\circ}$ e truncamento de 64 μm , foi usada devido à sua capacidade de gerar uma taxa de cisalhamento uniforme nas amostras. As curvas de fluxo em estado estacionário foram obtidas em modo de estresse controlado na faixa de taxa de cisalhamento de $0,1\text{--}100\text{ s}^{-1}$. Todas as amostras foram medidas em triplicata. O modelo de Carreau (Eq. (2)) foi ajustado aos dados experimentais (RAO, 2014):

$$\eta_{ap} = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{\left[1 + \left(\frac{\gamma}{\gamma_c}\right)^{\lambda}\right]^N} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

onde η é a viscosidade aparente (Pa.s), γ' é a taxa de cisalhamento (s^{-1}), η_{∞} é a viscosidade aparente na taxa de cisalhamento infinita (Pa.s), η_0 é a viscosidade aparente na taxa de cisalhamento zero (Pa.s), N é o expoente adimensional, e γ' é a taxa de cisalhamento crítica (s^{-1}) que marca o fim do platô Newtoniano e/ou o início da região de afinamento por cisalhamento.

4.2.7 Análise estatística

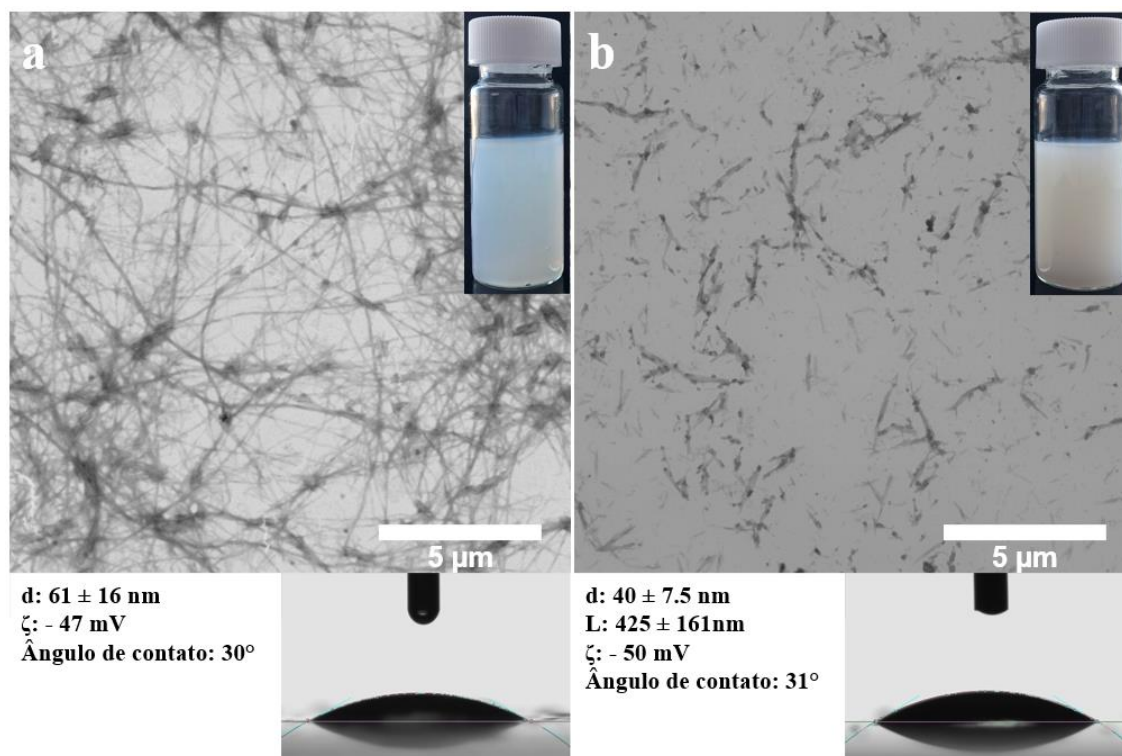
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Origin (versão 9.1). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente por análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de $p \leq 0,05$, ou teste t com nível de significância de $p \leq 0,05$.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização físico-química das nanoceluloses: nanofibrilas e nanocristais

Nanofibrilas de celulose (CBNF) foram produzidas por desfibrilação mecânica de fibras de celulose bacteriana e oxidação mediada por TEMPO. A formação de grupos carboxílicos na superfície das CBNF foi determinada por titulação de condutividade elétrica. A Fig. 1a mostra as imagens de MET das CBNF, onde nanofibrilas individualizadas e bem distribuídas podem ser observadas, com um diâmetro médio de 61 ± 16 nm, variando de 25 a 146 nm, e com comprimento de vários micrômetros. A oxidação levou à formação de grupos carboxilato ($0,77 \text{ mmol COO}^{-} \cdot \text{g}^{-1}$ celulose, equivalente a 12,7 %), originando repulsões eletrostáticas entre as cadeias de celulose, o que facilitou a fibrilação e dispersão em meios aquosos, ao mesmo tempo em que reduziu a viscosidade da amostra. A aparência final da dispersão de CBNF era de um gel opaco e branco (Fig. 4.1a).

Figura 4.1 – Micrografias de MET, diâmetro (d), comprimento (L), potencial zeta e ângulo de contato das CBNF (a) e NCCB (b). A barra de escala é de 5 μm . As fotografias foram tiradas no dia seguinte à preparação.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A hidrólise com ácido sulfúrico da celulose bacteriana resultou em nanocristais com comprimentos (C) variando de 133 a 870 nm e diâmetros (d) entre 20 e 60 nm, representando um comprimento médio de $425 \pm 161 \text{ nm}$ e uma largura média (d) de $40 \pm 7,5 \text{ nm}$, correspondendo a uma razão de aspecto (L/d) de 11. A aparência final da dispersão de NCCB foi uma dispersão homogênea e turva, com um teor de sólidos de 1,87 % (m/m) (Fig. 1b). Uma aparência semelhante foi relatada para a suspensão de nanocristais (1 %) obtida a partir de celulose vegetal pura (LI et al., 2015).

Tanto as nanofibrilas quanto os nanocristais exibiram alta carga superficial (negativa) em módulo ($>|45| \text{ mV}$), o que evita fenômenos de instabilidade devido à predominância de forças de repulsão eletrostática (PINTO et al., 2016). Dispersões estáveis de nanofibrilas de celulose oxidadas, preparadas por oxidação com TEMPO/NaOCl/NaBr, e nanocristais, obtidos sob condições similares de hidrólise ácida com ácido sulfúrico, foram alcançadas com potenciais zeta de $-45,01 \pm 5 \text{ mV}$ (COURTENAY et al., 2021) e $-47,96 \pm 0,14 \text{ mV}$, respectivamente (WU et al., 2021; H. ZHANG et al., 2019). Ambas as dispersões

(nanocristais e nanofibrilas) permaneceram estáveis por 12 meses quando armazenadas em uma câmara fria (4 °C).

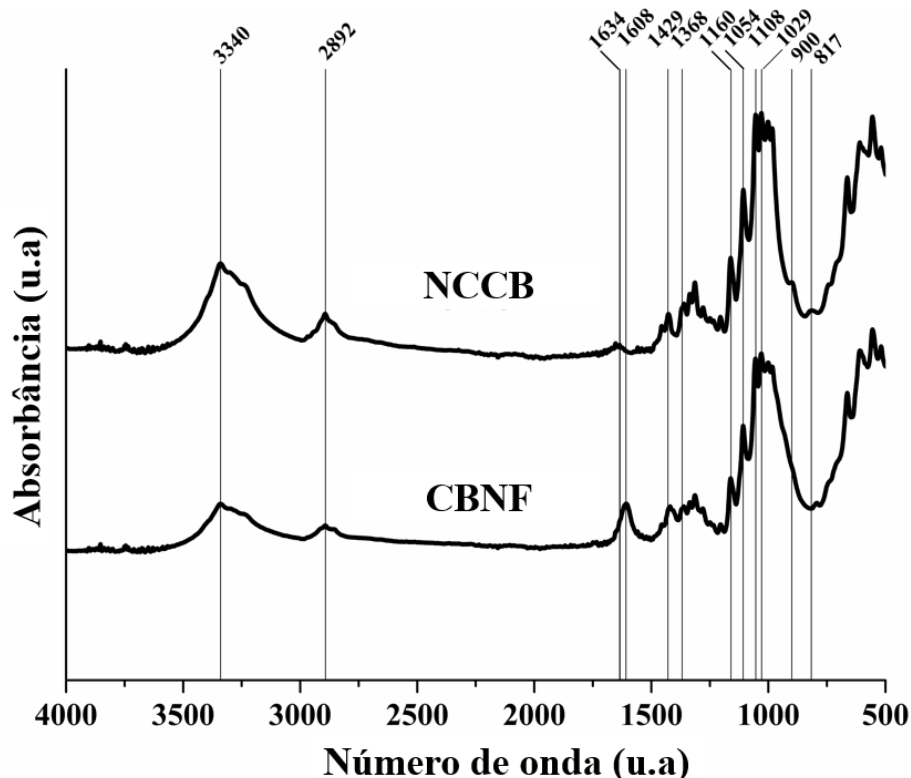
A molhabilidade do material de Pickering é um parâmetro chave para controlar a estabilidade da emulsão (BINKS & LUMSDON, 2000). Esta propriedade pode ser avaliada medindo a tendência de um líquido de se espalhar sobre uma superfície sólida, denotada pelo ângulo de contato θ (ZENG et al., 2024). Tipicamente, partículas com ângulo de contato $< 90^\circ$, associadas a um comportamento moderadamente hidrofílico, tendem a estabilizar emulsões óleo-em-água (ÓLEO EM ÁGUA) (BAO et al., 2021; PARAJULI & UREÑA-BENAVIDES, 2022). O ângulo de contato obtido para superfícies contendo CBNF ou NCCB foi de 30° ou 31° (Fig. 1), respectivamente, indicando alta hidrofiliacidez ou molhabilidade, o que pode não ser energeticamente favorável para a adsorção de partículas na interface óleo/água.

Apesar da tendência de partículas hidrofílicas permanecerem na fase aquosa, outros fatores influenciam a estabilização de um sistema coloidal. Na presença de sal, por exemplo, as superfícies se neutralizam e se tornam menos hidrofílicas, facilitando potencialmente a migração de partículas para a interface, onde podem se adsorver e contribuir para a estabilização da emulsão. Isso significa que, na prática, estabilizadores de Pickering com alta ou baixa molhabilidade podem promover a formação de emulsões óleo-em-água altamente estáveis a longo prazo, considerando o método de emulsificação (XU et al., 2005), modulação da carga superficial (ALBERT et al., 2019), tamanho (BINKS & LUMSDON, 2000) ou a natureza das partículas utilizadas (HU et al., 2020; KALASHNIKOVA et al., 2011; Q. LI et al., 2022).

4.3.1.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR de CBNF ou NCCB são mostrados na Figura 4.2. Linhas verticais destacam as bandas de absorção características dos materiais. Os espectros mostraram bandas características da celulose. Ambas as amostras apresentaram uma banda larga em 3340 cm^{-1} , atribuída à frequência de estiramento do grupo -OH , bem como às ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares na celulose (ANDRADE et al., 2019). A banda característica em torno de 2892 cm^{-1} foi atribuída à vibração de estiramento da ligação simples H dos grupos C-H_2 e C-H_3 ou às vibrações de estiramento assimétricas e simétricas de CH_2 , frequentemente encontradas nos componentes das fibras de celulose (KHAN et al., 2020).

Figura 4.2 – Espectros FTIR das suspensões de CBNF e NCCB.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As bandas em 1429 cm^{-1} e 1368 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular assimétrica das ligações C-H e à deformação angular simétrica das ligações C-H, respectivamente.

A absorção em 1163 cm^{-1} foi devido ao estiramento assimétrico das ligações glicosídicas C-O-C, e os estiramentos em 1108 cm^{-1} e 1054 cm^{-1} foram atribuídos às ligações C-OH e C-C-OH em álcoois secundários e primários, respectivamente (AJKIDKARN & MANUSPIYA, 2020; VASCONCELOS et al., 2017). A banda em torno de 1029 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-O e a uma vibração da celulose amorfa, resultante do estiramento do anel de glicose, que produziu uma banda em torno de 900 cm^{-1} (DO NASCIMENTO et al., 2019). A banda em 900 cm^{-1} estava presente com menor intensidade em CBNF devido à forte reação de oxidação que eliminou a celulose amorfa (PEREIRA et al., 2020). O pico em torno de 817 cm^{-1} foi atribuído à vibração de estiramento C-O-C (Pandi et al., 2021).

No espectro de CBNF, a banda em 1608 cm^{-1} , característica do grupo -COO-Na^+ (estiramento do grupo -COO-), confirma a presença de grupos carboxílicos introduzidos pela

oxidação mediada por TEMPO (N. ZHANG et al., 2016). No espectro FTIR de NCCB, a banda em 1634 cm^{-1} foi atribuída ao modo de flexão da água absorvida (ANDRADE et al., 2019). Em contraste, a banda em 807 cm^{-1} (ligações vibratórias simétricas das ligações C-O-S dos grupos C-O-SO₃-) resultante da esterificação do H₂SO₄ na reação de hidrólise ácida em NCCB não foi detectada devido à pequena quantidade de grupos sulfato ligados à vibração (AJKIDKARN & MANUSPIYA, 2020; ARSERIM-UÇAR et al., 2021; VASCONCELOS et al., 2017).

4.3.1.2 Tensão interfacial na interface óleo-água

As propriedades morfológicas (FUJISAWA et al., 2017) e a concentração (MARTINS et al., 2020a) da nanocelulose têm um efeito significativo em sua capacidade emulsificante, como a capacidade de reduzir a tensão interfacial.

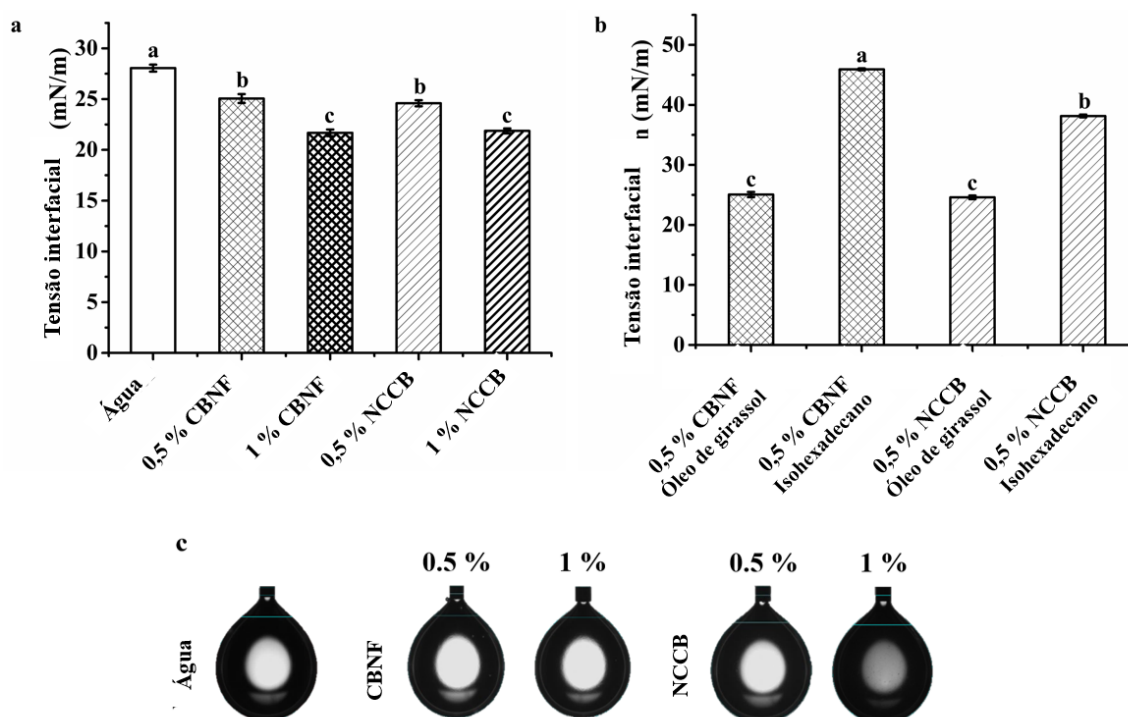
A tensão interfacial óleo-água do óleo de girassol para CBNF ou NCCB em diferentes concentrações foi analisada. A Fig. 4.3 mostra a morfologia das gotas e a projeção do comportamento de CBNF ou NCCB na interface óleo/água, em função da concentração de nanocelulose. Como esperado, a tensão interfacial diminuiu com o aumento da concentração de nanocelulose (CBNF ou NCCB). Nas concentrações estudadas, a tensão interfacial não foi estatisticamente diferente para ambas as nanoceluloses.

Estudos recentes mostraram que a capacidade de adsorção de CBNFs com um conteúdo de grupo carboxilato de 0,01 % (a amostra utilizada neste trabalho possui 12 % de oxidação) em uma gota de suspensão na interface de dodecano (densidade de 0,75 g/mL (THOMPSON et al., 2015)) com água foi capaz de reduzir a tensão interfacial para 42,5–52,5 mN/m (WU et al., 2021). Neste estudo, 0,5 % de CBNF ou NCCB foi capaz de reduzir a tensão na interface óleo-água para $25,06 \pm 0,44$ ou $24,59 \pm 0,30$ mN/m, respectivamente. Uma baixa concentração de nanocelulose pode exibir comportamento de adsorção eficaz na interface óleo-água, atribuída tanto aos grupos carregados quanto às características morfológicas.

No entanto, além da concentração de nanocelulose, propriedades físicas (como densidade e viscosidade) entre as fases dispersa e contínua também podem influenciar o comportamento de estabilidade de uma emulsão (K. ZHANG et al., 2024). Em geral, propriedades físicas semelhantes implicam uma taxa de *creaming* mais lenta em comparação com gotas ÓLEO EM ÁGUA de mesmo tamanho médio (DICKINSON, 2019). Nesse contexto, o comportamento de CBNF ou NCCB na interface com isohexadecano, uma fase dispersa de

menor densidade (0,79 g/mL, 20 °C), permite uma melhor avaliação do desempenho dos novos sistemas propostos (MARTINS et al., 2020a). A Fig. 4.3b mostra menor tensão interfacial com óleo de girassol para ambas as nanoceluloses, sugerindo que as suspensões aquosas de CBNF e NCCB podem ter densidades mais próximas do óleo de girassol (0,92 g/mL) em comparação com o isohexadecano. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores (MARTINS et al., 2020a; WU et al., 2021).

Figura 4.3 – (a) Tensão interfacial da interface óleo de girassol-água em diferentes concentrações de CBNF ou NCCB. (b) Tensão interfacial da interface óleo de girassol-água ou óleo isohexadecano-água, com uma concentração de 0,5 % de CBNF ou NCCB. (c) Ilustração da formação de filme surfactante de CBNF ou NCCB na interface óleo de girassol-água usando o método da gota pendente. Os valores reportados são as médias (n = 3). Valores seguidos por pelo menos uma letra comum não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4. Emulsões de Pickering

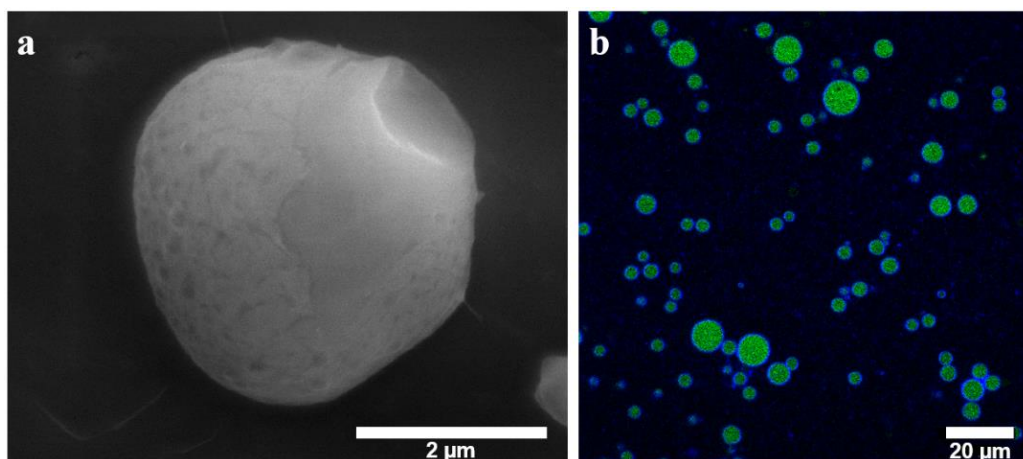
4.4.1 Caracterização físico-química

Neste trabalho, foram realizados estudos para examinar o efeito da BC carregada (CBNF ou NCCB) e da concentração de sal no tamanho das gotas, na estabilidade à temperatura

ambiente (preparadas recentemente ou após 30 dias de armazenamento) ou em relação às forças centrífugas, e na reologia das emulsões de Pickering com baixo teor de óleo. A estruturação da BC em gotas de emulsão foi observada usando Cryo-SEM e CLSM.

A imagem de Cryo-SEM (Fig. 4.4a) mostra a nanocelulose na superfície das gotas de emulsão. NCCB parece ser capaz de se adsorver em camadas como estabilizadores de Pickering na interface de emulsões com baixo teor de óleo (1 %). Cada gota é cercada por uma camada contínua de NCCB, indicando que as gotas de óleo ficaram localizadas dentro da rede formada pelo arranjo de BC que ocorreu durante a emulsificação. A celulose foi corada com calcofluor e a fase oleosa com beta-caroteno (Fig. 4.4b) para observação com CLSM. Novamente, a nanocelulose pode ser encontrada concentrada na interface, fornecendo impedimento estérico e estabilizando as gotas de óleo.

Figura 4.4 – Imagem de Cryo-SEM (a) de uma emulsão com baixa fração de óleo (1 %) estabilizada com 1 % de NCCB e 50 mM de NaCl, e CLSM (b) de uma emulsão com 10 % de óleo incorporado com 0,05 % de beta-caroteno (verde), estabilizada com 1 % de NCCB (corado com Calcofluor - azul) e 50 mM de NaCl. A imagem mostra uma área de $512 \times 512 \mu\text{m}$ de um mosaico 4x4 capturado com um objetivo de 63x de ampliação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os tamanhos de gotas estabilizadas por diferentes concentrações de CBNF ou NCCB são mostrados na Tabela 4.1. As micrografias correspondentes após a preparação (0 dia) ou após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente (30 dias) são exibidas na Fig. 4.5, Fig. 4.6.

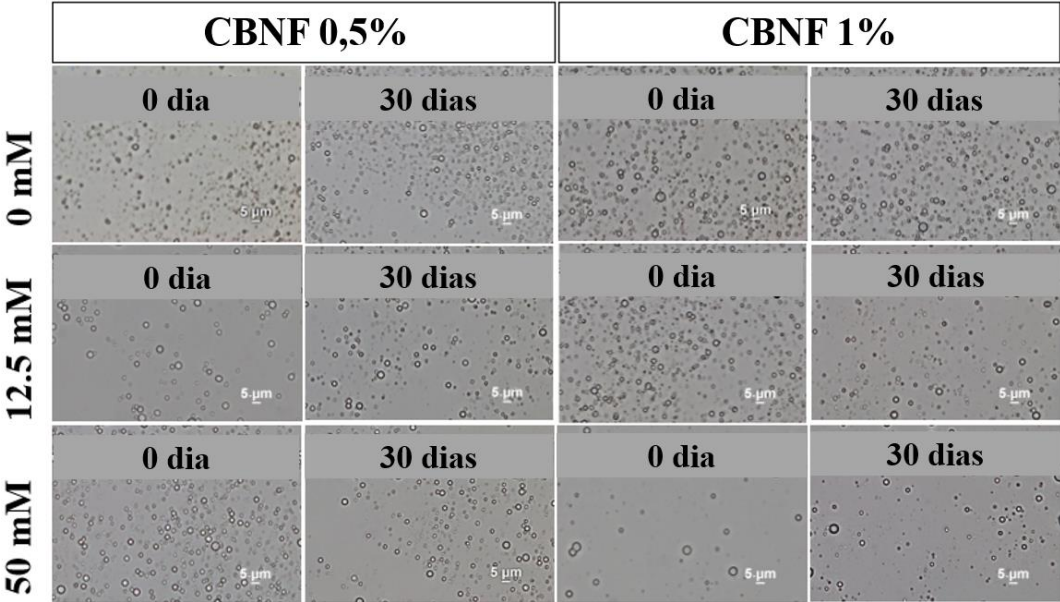
Tabela 4.1 – Efeito da nanocelulose e da concentração de sal no tamanho das gotas de emulsões com baixa fração de óleo de girassol (1% v/v) ao longo do tempo.

		(0.5 % m/v)		(1 % m/v)	
NaCl (mM)		Tamanho $D_{(3,2)}$ (μm)		Tamanho $D_{(3,2)}$ (μm)	
		0 dia	30 dias	0 dia	30 dias
CBNF	0	2,07 $\pm$ 0,13 ^{bc,*,#}	3,08 $\pm$ 0,39 [*]	3,20 $\pm$ 0,23 ^{b,#}	3,22 $\pm$ 0,10
	12,5	2,75 $\pm$ 0,26 ^{ab,*}	3,54 $\pm$ 0,30 [*]	2,77 $\pm$ 0,20 ^b	2,93 $\pm$ 0,10
	50	2,90 $\pm$ 0,44 ^{a,#}	3,01 $\pm$ 0,38	4,13 $\pm$ 0,31 ^{a,#}	4,10 $\pm$ 0,19
NCCB	0	1,73 $\pm$ 0,17 ^{c,*}	6,20 $\pm$ 0,24 [*]	1,77 $\pm$ 0,20 ^c	1,97 $\pm$ 0,30
	12,5	1,97 $\pm$ 0,25 ^c	1,89 $\pm$ 0,17	2,04 $\pm$ 0,26 ^c	2,55 $\pm$ 0,54
	50	2,80 $\pm$ 0,26 ^{ab}	3,20 $\pm$ 0,22	3,06 $\pm$ 0,18 ^b	3,17 $\pm$ 0,20

Os valores relatados são médias $\pm$ desvio padrão. Valores na mesma coluna seguidos por pelo menos uma letra minúscula comum não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). Pares de valores (entre 0 e 30 dias) seguidos por * são significativamente diferentes entre si (teste t, $p \leq 0,05$). Pares de valores (no dia 0, entre diferentes concentrações de nanocelulose) seguidos por # são significativamente diferentes entre si (teste t, $p \leq 0,05$).

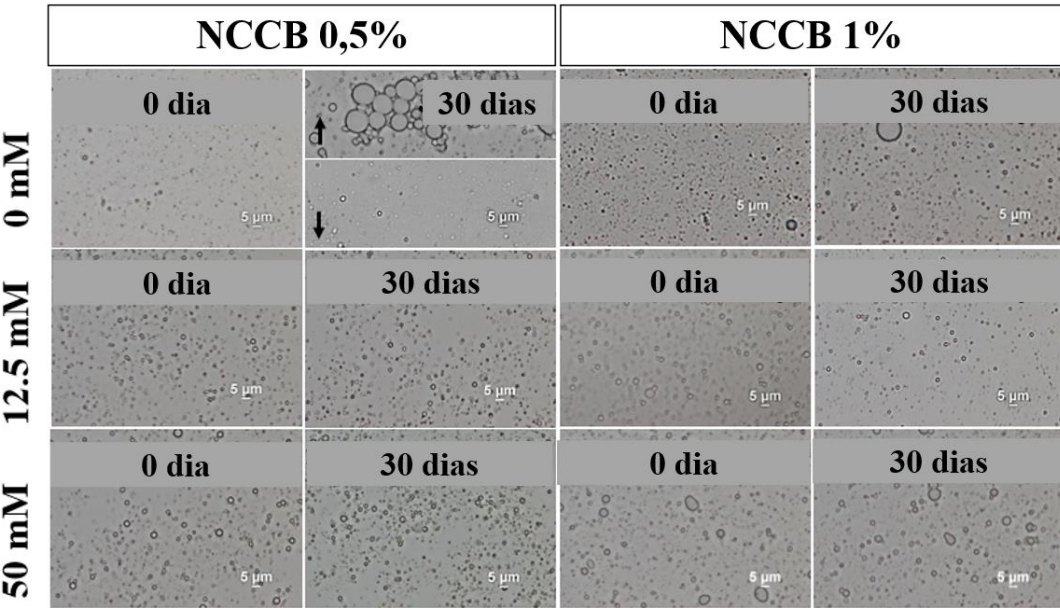
De maneira geral, as emulsões exibiram um comportamento estável (Fig. 4.5, Fig. 4.6), e o tamanho médio das gotículas variou entre valores inferiores a 5 μm (1,73–4,13 μm). Valores semelhantes foram relatados para emulsões com baixo teor de óleo (1 % de óleo de girassol) estabilizadas por depleção em um sistema duplo contendo nanocristais não adsorvente (obtido a partir de papel filtro de fibra de algodão e hidrolisado com ácido sulfúrico a 64 % m/m) e nanofibrilas (preparado por desintegração de madeira de sulfito totalmente branqueada, não seca e livre de finos (bétula) através de um microfluidizador de alta pressão) na fase aquosa (2,2 $\pm$ 0,2 μm) (BAI et al., 2018). Afirmamos que a microestrutura final das emulsões pode ser determinada pela fração volumétrica de óleo em relação ao estabilizador Pickering disponível, com o tamanho das gotículas controlado pelo fenômeno limitado de coalescência. Em outras palavras, o equilíbrio correto entre a fração reduzida de óleo e o estabilizador Pickering tende a produzir tamanhos médios menores das gotículas, e sua formação e estabilidade dependem desse equilíbrio (LOW et al., 2020).

Figura 4.5 – Microscopia óptica de emulsões de Pickering estabilizadas por CBNF (0,5% ou 1% m/v) sob diferentes forças iônicas (0, 12,5 e 50 mM) após preparação ou após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente. A barra de escala é de 5 μ m.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4.6 – Microscopia óptica de emulsões de Pickering estabilizadas por NCCB (0,5% ou 1% m/v) sob diferentes forças iônicas (0, 12,5 e 50 mM) após preparação ou após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente. As setas nas imagens de microscopia indicam as fases superior e inferior formadas. A barra de escala é de 5 μ m.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Particularmente, emulsões sem sal, estabilizadas com 1 % de CBNF, formaram gotículas maiores em comparação com as gotículas estabilizadas com NCCB na mesma concentração de BC. Neste ponto, a influência da forma e tamanho do BC (bastões curtos ou fibrilas longas) foi predominante em afetar o tamanho médio das gotículas. O CBNF tem uma alta razão de aspecto e, portanto, pode tender a adsorver mais lentamente na interface, aumentando o tamanho final das gotículas (ALBERT et al., 2019). Além disso, bastões curtos de NCCB podem formar uma organização mais densa na superfície das gotículas (KALASHNIKOVA et al., 2013). No geral, o comprimento da nanocelulose pode ajustar a estrutura das emulsões, desde gotículas individuais (nanocelulose curta) até estruturas de rede emaranhadas (nanocelulose longa), resultando em sistemas de estabilização distintos (DAI et al., 2020).

Ao considerar a adição de sal, houve uma tendência aparente para todas as emulsões, que é o aumento do tamanho das gotículas conforme a concentração de sal aumenta de 0 a 50 mM. No entanto, um efeito mais proeminente foi observado em emulsões estabilizadas com NCCB a 50 mM de NaCl. Neste caso, as gotículas formadas com 0,5 % de NCCB ($2,80 \pm 0,26 \mu\text{m}$) ou 1 % de NCCB ($3,06 \pm 0,18 \mu\text{m}$) eram 62 % e 73 % maiores em tamanho do que nas emulsões sem sal ($1,73 \pm 0,17 \mu\text{m}$ e $1,77 \pm 0,20 \mu\text{m}$, respectivamente), sem comprometer a estabilidade ao longo de 30 dias. Essa tendência também foi observada em emulsões com fração reduzida de óleo, estabilizadas com nanofibrilas de celulose vegetal sujeitas à oxidação mediada por TEMPO/NaOCl/NaBr e nanofibrilas não adsorventes (desintegrados por microfluidização de alta pressão) como agente de depleção em diferentes concentrações de NaCl (em massa): $3,6 \mu\text{m}$ (0 % de NaCl), $6,9 \mu\text{m}$ (0,004 % de NaCl) e $11,0 \mu\text{m}$ (0,006 % de NaCl) (Guo et al., 2022).

4.4.2 Estabilidade

Um aspecto crítico das emulsões diz respeito à sua estabilidade. Termodinamicamente, uma emulsão é considerada estável quando a quantidade e o tamanho das gotículas na fase interna, por unidade de volume da fase contínua, permanecem consistentes ao longo do tempo. Isso implica que não há alterações no valor energético do sistema ou em sua área interfacial.

Tanto CBNF quanto NCCB foram capazes de formar emulsões macroscópicas estáveis a uma concentração de 1 %, sem mostrar instabilidade após 30 dias de armazenamento

em temperatura ambiente (Tabela 4.1). Neste caso, ambas as nanoceluloses demonstraram boa estabilidade em todas as concentrações de sal testadas (0, 12,5 e 50 mM), conforme confirmado pela microscopia (Fig. 4.5, Fig. 4.6). Por outro lado, emulsões contendo 0,5 % de CBNF ou NCCB na ausência de sal experimentaram um aumento significativo no tamanho médio das gotículas de $2,07 \pm 0,13$ e $1,73 \pm 0,17$ μm para $3,08 \pm 0,39$ e $6,20 \pm 0,24$ μm , respectivamente. Emulsões contendo 0,5 % de NCCB também foram acompanhadas pela formação de uma camada fina de creme na superfície ao longo de 30 dias, com gotículas de óleo coalescendo, conforme revelado pela avaliação microscópica (Fig. 4.6). No entanto, na menor concentração de sal (12,5 mM), 0,5 % de NCCB estabilizou efetivamente as emulsões, formando gotículas de $1,97 \pm 0,25$ μm que permaneceram estáveis após 30 dias ($1,89 \pm 0,17$ μm). Em contraste, a estabilidade das emulsões contendo 0,5 % de CBNF foi alcançada na presença de 50 mM de NaCl.

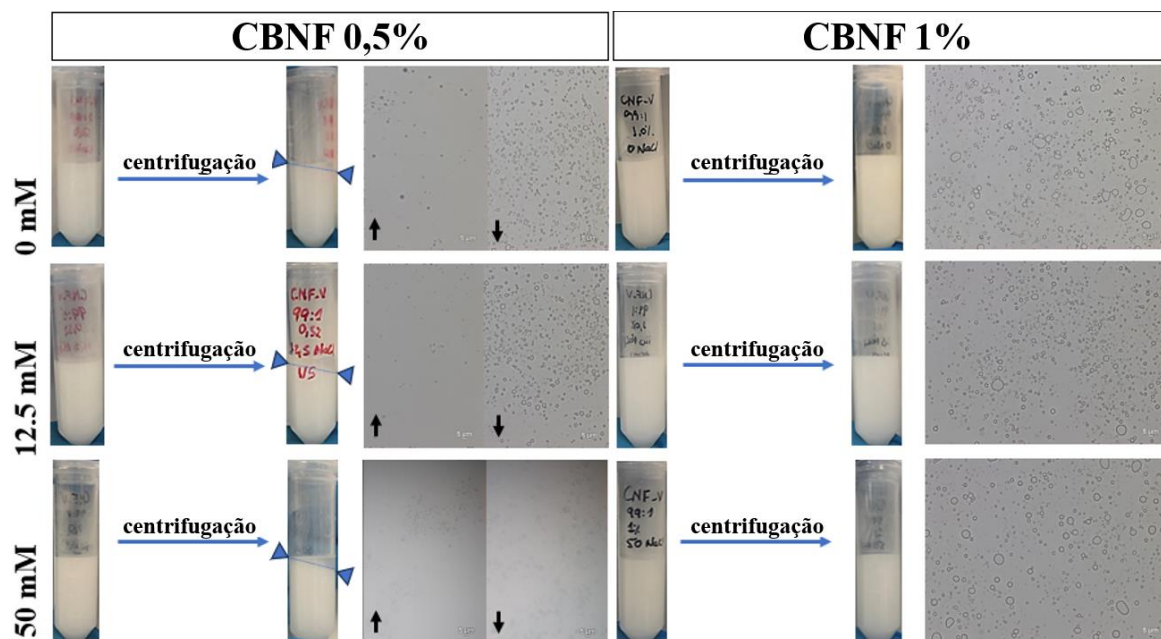
Emulsões com fração de óleo reduzida são sistemas diluídos, representando, portanto, um conjunto de gotículas mais dispersas. Assim, embora os sistemas com CBNF geralmente se beneficiem da estrutura de rede de gel formada na fase aquosa (proporcionada pela alta razão de aspecto das nanofibrilas) (BAI et al., 2018; COURTENAY et al., 2021; GUO et al., 2022), nesta concentração (0,5 %), eles não foram efetivamente adsorvidos em sistemas com baixa fração de óleo, onde o CBNF era o único agente estabilizante.

Por outro lado, emulsões contendo frações maiores de óleo aumentam a fração de empacotamento das gotículas de óleo e, conseqüentemente, apresentam uma área hidrodinâmica menor na fase contínua (DICKINSON & GOLDING, 1997; SUN & GUNASEKARAN, 2009). Assim, o papel das fibrilas longas em cobrir as gotículas e preencher a fase contínua, mesmo em concentrações menores, pode ser efetivo (GOI et al., 2019). Portanto, o diâmetro das gotículas formadas é controlado pela concentração de nanocelulose e seu arranjo na interface, refletindo sua estabilidade ao longo do tempo (SCHMITT et al., 2014). Neste caso, a dosagem do estabilizante como uma porcentagem da fase oleosa também pode ser considerada (GESTRANIUS et al., 2017).

Sob força centrífuga, os sistemas contendo baixa concentração de CBNF (0,5 %) não eram estáveis (Fig. 4.7). Nessas circunstâncias, a força aplicada à emulsão aumentou a fração de empacotamento das gotículas de óleo, reduzindo a área hidrodinâmica na fase contínua. Sob essas condições, as emulsões contendo 1 % de CBNF não apresentaram creme, mantendo sua aparência inicial. No entanto, neste sistema, a microscopia revelou que a emulsão

sem sal era mais suscetível à coalescência, enquanto as emulsões com sal mantiveram gotículas individualizadas (Fig. 4.7). A presença de sal, portanto, também desempenhou um papel eficaz nas emulsões com 1 % de CBNF, promovendo a formação de longas redes de gel para a cobertura das gotículas e preenchimento da fase contínua contra coalescência ou floculação. Assim, a forma da nanocelulose bacteriana também é um fator relevante na determinação da estabilidade das emulsões Pickering.

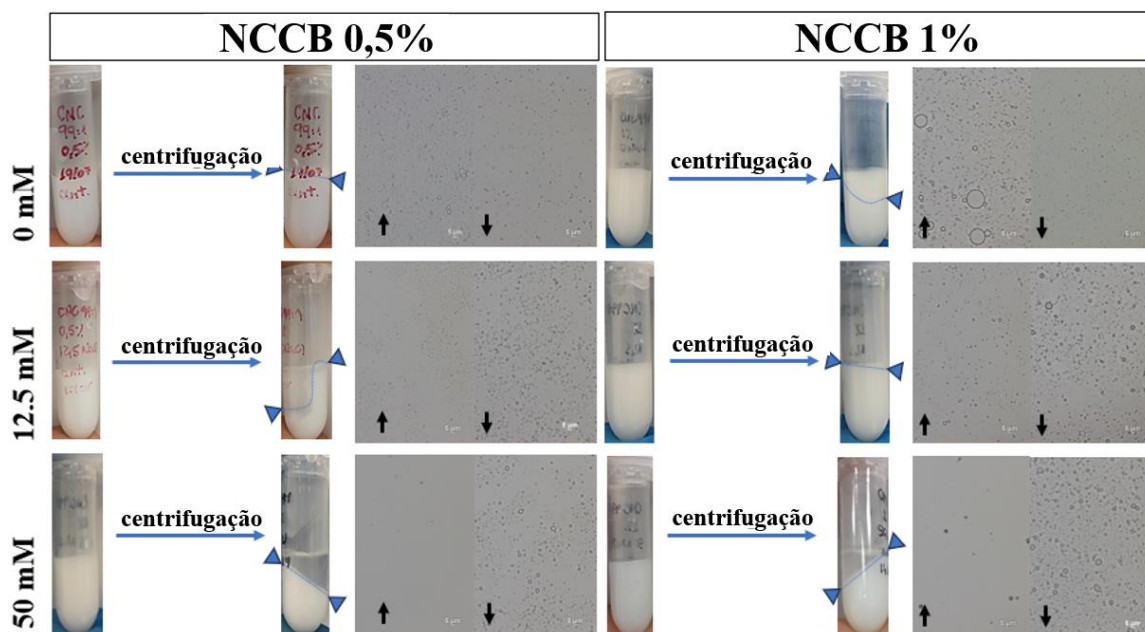
Figura 4.7 – Imagens de emulsões Pickering estabilizadas por CBNF (0,5 % ou 1 % m/v) sob diferentes forças iônicas (0, 12,5 e 50 mM) antes (30 mins após a emulsificação) e após centrifugação (1520 g por 2 mins). A microscopia óptica foi utilizada para avaliar as gotículas após a centrifugação. Setas nas imagens de microscopia indicam as fases superior e inferior formadas. A barra de escala é 5 μ m.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os sistemas contendo NCCB eram mais instáveis, acelerando os processos de floculação e coalescência das gotículas de óleo após a centrifugação (Fig. 4.8). Para os sistemas NCCB contendo sal, a centrifugação resultou em um fenômeno de *creaming*, concentrando as gotículas na fase inferior, mas sem separação de fases, sugerindo uma forte adsorção de BC na interface ÓLEO EM ÁGUA. Isso é confirmado pelas imagens de microscopia do creme após a centrifugação.

Figura 4.8 – Imagens de emulsões Pickering estabilizadas por CBNF (0,5 % ou 1 % m/v) sob diferentes forças iônicas (0, 12,5 e 50 mM) antes (30 min após a emulsificação) e após centrifugação (1520 g por 2 min). A microscopia óptica foi usada para avaliar as gotículas após a centrifugação. Setas nas imagens de microscopia indicam as fases superior e inferior formadas. A barra de escala é de 5 μm .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, a presença de cargas superficiais devido aos grupos carboxílicos (CBNF) ou ésteres de sulfato (NCCB) deve ser de densidade suficiente para promover a repulsão eletrostática entre as partículas de nanocelulose, sem impedir que elas se adsorvam na gotícula de óleo (BOUGHRIBA et al., 2021; WU et al., 2022). Quando a nanocelulose carregada negativamente se move em direção à interface óleo-água, que também é carregada negativamente devido à adsorção preferencial de íons hidroxila, ocorre uma repulsão significativa. Essa repulsão pode criar uma barreira energética que impede a adsorção de partículas na interface da gotícula, o que pode levar à formação de uma estrutura fraca ou menos densa ao redor das gotículas de óleo, como também relatado (JIMÉNEZ SAELICES & CAPRON, 2018; VARANASI et al., 2018).

A estrutura fraca ou menos densa pode promover o rearranjo das partículas que, dada a alta área de superfície de cobertura e menor concentração no meio, tendem a se organizar em novas gotículas coalescidas com uma área de superfície menor, levando a um aumento em seus diâmetros médios (JIMÉNEZ SAELICES & CAPRON, 2018). Assim, uma alta densidade de carga superficial pode inevitavelmente levar à quebra da emulsão por repulsão eletrostática.

Em emulsões estabilizadas com 0,5 % de CBNF ou NCCB, houve um aumento no tamanho das gotículas ao longo do tempo devido à maior mobilidade das partículas carregadas. Nesse caso, a formação de emulsões estáveis usando baixas concentrações de nanocelulose é prejudicada.

Por outro lado, 1 % de CBNF ou NCCB foram capazes de estabilizar as emulsões. Pode-se inferir que uma concentração aumentada leva a uma melhor cobertura da interface e à estruturação aprimorada da fase contínua, contribuindo assim para uma maior estabilidade. Os agregados formados têm uma energia de adsorção maior que predomina sobre a força de repulsão entre as nanoceluloses e a interface óleo-água. Os agregados adsorvidos minimizam a energia livre interfacial principalmente reduzindo a área interfacial entre as interfaces óleo-água. Portanto, em uma concentração de 1 %, as nanoceluloses foram capazes de estabilizar emulsões com baixo teor de óleo (VARANASI et al., 2018).

4.4.3 Efeito da adição de NaCl

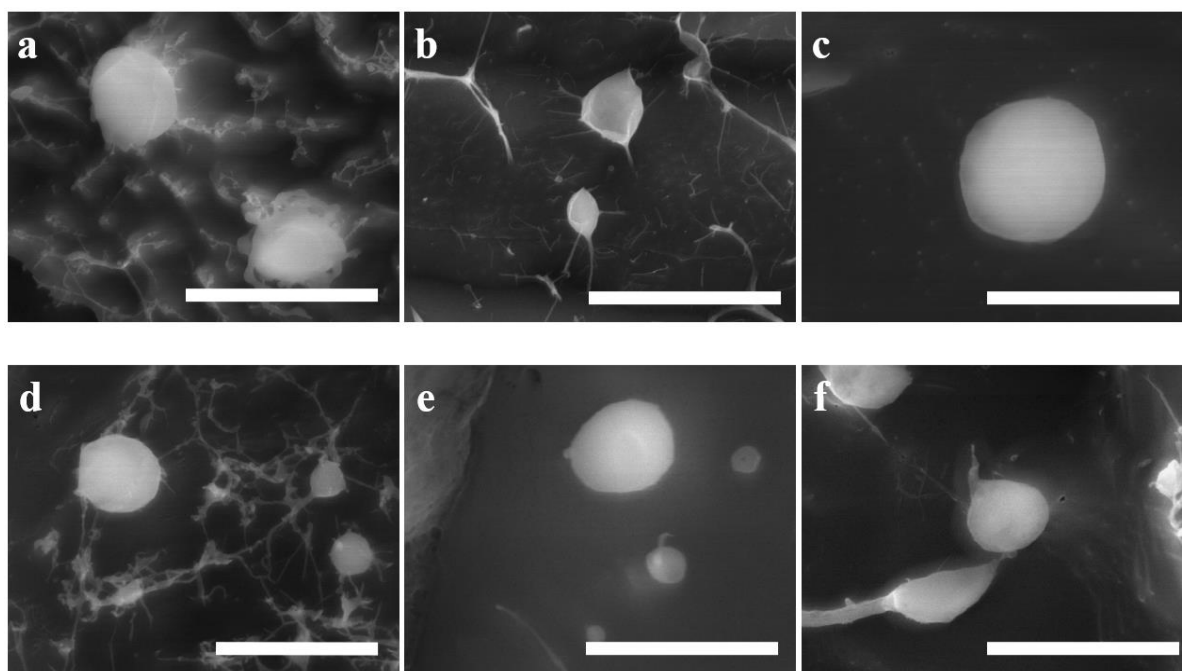
Em sistemas contendo surfactantes convencionais de baixo peso molecular, a adição de sais reduz a repulsão iônica entre os grupos principais e induz transições de fase, formando estruturas micelares mais complexas. Neste ponto, os eletrólitos favorecem a organização das moléculas em micelas esféricas que se combinam para formar estruturas hexagonais, refletindo um aumento na viscosidade do sistema (CORNWELL, 2018).

Em emulsões Pickering, estabilizadas com NCCB, a adição de NaCl também proporcionou um fenômeno de aumento de viscosidade, observado até macroscopicamente. Como mencionado anteriormente, quando o sal está presente, as superfícies são neutralizadas e se tornam menos hidrofílicas. Esta condição potencialmente auxilia a migração de partículas para a interface, onde elas podem se adsorver e desempenhar um papel na estabilização da emulsão. Em emulsões com CBNF, esse comportamento não foi observado macroscopicamente, mas exibiu uma resposta reológica positiva à maior estruturação das nanofibrilas na interface das gotículas das emulsões com baixo teor de óleo (WU et al., 2021).

O posicionamento dos íons contra-íon do eletrólito NaCl em nanopartículas de nanocelulose bacteriana altamente carregadas ($>|45|$ mV) foi capaz de reduzir a repulsão eletrostática, favorecendo melhores interações na interface óleo-água. Além do evidente aumento da viscosidade, o NaCl também desempenhou um papel importante na formação e estabilidade das emulsões. Em emulsões com 0,5 % de NCCB, a adição de 12,5 mM foi capaz

de orientar os nanocristais de celulose na superfície das gotículas de óleo, reduzindo a necessidade de aumentar a concentração de nanocelulose (1 %) para promover uma estabilidade aprimorada (L. LIU et al., 2018; VARANASI et al., 2018). A microscopia Cryo-SEM conseguiu capturar o arranjo de NCCB ou CBNF em emulsões com 0, 12,5 ou 50 mM de NaCl, evidenciando a migração da nanocelulose em direção à superfície das gotículas de óleo quando o NaCl foi adicionado (Fig. 4.9).

Figura 4.9 – Imagens de Cryo-SEM de emulsões com 0,5 % de CBNF (a, b, c) ou NCCB (d, e, f) sem sal (a, d), com 12,5 mM (b, e) ou 50 mM NaCl (c, f). As barras de escala são: a – 3 μm , b – 6 μm , c – 2 μm , d – 2 μm , e – 2 μm e f – 2 μm .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em ambos os casos, com uma concentração de 50 mM NaCl, os diâmetros médios das gotas após a preparação aumentaram em 1 μm , onde a nanocelulose não adsorvida sofre uma redução na carga eletrostática, favorecendo a deposição de novas partículas e o empilhamento de camadas na interface óleo-água (F. LIU & TANG, 2016). O tamanho da nanocelulose desempenha um papel crucial no tamanho das gotas de óleo. Tamanhos maiores resultam em emulsões com gotas maiores. A adição de sal reduz a carga das nanopartículas, diminuindo a repulsão eletrostática. Isso leva à aglomeração das nanoceluloses, formando estruturas de rede que, por sua vez, interferem no tamanho das gotas formadas. Embora sejam produzidas gotas maiores, a forte rede coesiva formada pela agregação da nanocelulose

proporciona uma ancoragem robusta na interface óleo-água, como observado pela estabilidade das emulsões ao longo de 30 dias.

Neste caso, possivelmente obtemos uma emulsão mais estável, resistente à quebra e separação de fases (SCHRÖDER et al., 2018), caracterizando-a como um sistema de emulsão modelo com comportamento inibitório da digestão lipídica, projetado para aplicação em produtos de baixo teor calórico, por exemplo (B. LIU et al., 2019). No entanto, a alta concentração de NaCl pode promover a quebra da emulsão devido à redução acentuada das cargas na superfície da nanocelulose.

Por outro lado, um sistema contendo uma baixa concentração de NaCl pode ser preferível, como uma alegação de saúde. Portanto, quando a adição de sal não é desejável, considerar o uso de uma maior concentração de nanocelulose torna-se relevante para decisões de formulação.

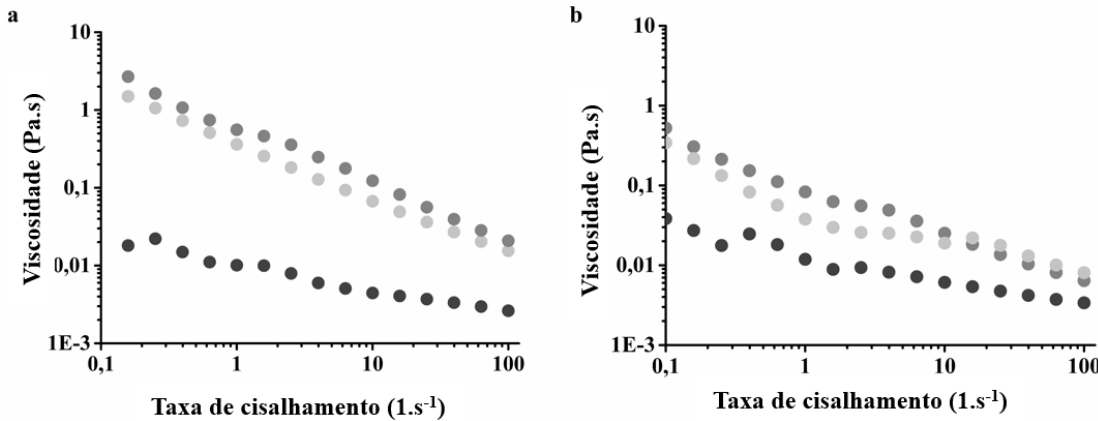
4.5. Reologia

A Figura 4.10 mostra a viscosidade das emulsões em função das taxas de cisalhamento das emulsões Pickering estabilizadas por CBNF ou NCCB. A partir da curva reológica, as emulsões exibiram um comportamento não-Newtoniano, que se manifestou como uma propriedade de redução de viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Estudos anteriores indicaram que, quando a taxa de cisalhamento aumenta gradualmente, a rede de gotas da emulsão é destruída pela força de cisalhamento, refletindo uma diminuição na viscosidade (JIA et al., 2019).

A Figura 4.10 também mostra que a viscosidade aparente das emulsões Pickering aumentou com a adição de NaCl. A razão para isso pode ser as propriedades anfífilicas da nanocelulose bacteriana, derivadas de seus grupos hidroxila e carboxila, e a organização cristalina juntamente com a extensa formação de ligações de hidrogênio nas cadeias poliméricas (ZUPPOLINI et al., 2022), além da força iônica que pode influenciar a densidade de carga e o tamanho do CBNF ou NCCB. YAN et al. (2017) observaram que, com o aumento da força iônica de 0 a 200 mM de NaCl, o potencial zeta e o tamanho dos nanocristais de celulose bacteriana aumentaram gradualmente devido ao efeito de blindagem eletrostática e ao efeito de agregação subsequente causado pela adição de NaCl (CHENGLIN et al., 2012). Esses autores observaram que a adição de NaCl induziu a blindagem eletrostática da celulose bacteriana

carregada e do NCCB via os íons contraíon (Na^+) (WEN et al., 2014). Em comparação, o CBNF apresentou um aumento maior na viscosidade em resposta à força iônica do que o NCCB, indicando melhores propriedades coloidais.

Figura 4.10 – Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para emulsões compostas por 0,5 % de CBNF (a) ou NCCB (b) sem sal (NaCl) (●) ou com diferentes concentrações de NaCl de 12,5 mM (●) and 50 mM (●)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para explorar esse efeito, os resultados experimentais foram ajustados ao modelo de Carreau e regressão não linear, e os parâmetros de ajuste correspondentes estão mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 4.2 – Modelagem da curva de fluxo usando o modelo de Carreau (Eq. (2)) para emulsões de Pickering compostas de nanofibrilas de celulose (CBNF).

Parâmetros	CBNF		
	0 mM NaCl	12.5 mM NaCl	50 mM NaCl
η_0	0.08 ± 0.03^b	78 ± 17^a	117 ± 62^a
η_∞	0.002 ± 0.0004^a	0.003 ± 0.0001^a	0.002 ± 0.001^a
$\dot{\gamma}_c$	1.8 ± 0.5^a	1393 ± 58^b	969 ± 59^c
N	0.42 ± 0.02^a	0.23 ± 0.02^b	0.25 ± 0.05^b
R^2_{adj}	0.9745	0.9996	0.9973

Os valores relatados são as médias $\pm$ desvios padrão (n = 3). Valores na mesma linha seguidos por pelo menos uma letra comum não são significativamente diferentes (p > 0,05).

Tabela 4.3 – Modelagem da curva de fluxo usando o modelo de Carreau (Eq. (2)) para emulsões de Pickering compostas de nanocristais de celulose (NCCB).

Parâmetros	NCCB		
	0 mM NaCl	12.5 mM NaCl	50 mM NaCl
η_0	0.09 ± 0.08^a	7 ± 1^b	4.8 ± 0.9^b
η_∞	0.001 ± 0.0003^a	0.001 ± 0.0003^a	0.005 ± 0.001^b
$\dot{\gamma}_c$	375.9 ± 0.4^a	1213.03 ± 141^b	1604.1 ± 93^c
N	0.58 ± 0.02^a	0.388 ± 0.01^b	0.424 ± 0.07^c
R^2_{adj}	0.9686	0.9951	0.9545

Os valores relatados são as médias $\pm$ desvios padrão (n = 3). Valores na mesma linha seguidos por pelo menos uma letra comum não são significativamente diferentes (p > 0,05).

O modelo de Carreau ajustou-se bem aos dados experimentais (R^2 ajustado > 0,95) para ambas as nanoceluloses (CBNF e NCCB). Este modelo tem sido aplicado para descrever o comportamento de fluxo de emulsões óleo-em-água (DANIEL-DA-SILVA et al., 2011; W. XU et al., 2021). Emulsões Pickering compostas por CBNF mostram um aumento dos valores de η_0 com o aumento da concentração de sal, e esse comportamento pode ser devido à diminuição do conteúdo de água. O aumento do sal afeta a conformação do polímero e, geralmente, um maior η_0 está correlacionado com uma conformação mais forte. Esse efeito é mais evidente em emulsões Pickering compostas por CBNF quando comparadas com NCCB, consistente com os resultados de Courtenay et al., 2021. Esse comportamento foi atribuído à força repulsiva entre as nanofibrilas resultante de sua densidade de carga e alto aspecto, levando a uma menor capacidade de aglomeração e menor fricção. Além disso, é possível observar que os tempos de relaxamento ($\dot{\gamma}_c$) são mais curtos para emulsões CBNF e NCCB, sem NaCl, o que está relacionado com a instabilidade da emulsão (*creaming*). O aumento da concentração de sal possibilita observar um aumento em $\dot{\gamma}_c$, sugerindo um aprimoramento das interações entre interações não covalentes. Também foi observado que os valores de η_∞ eram inferiores a 0,01, o que está de acordo com os resultados relatados por outros autores (TANG et al., 2021). Neste estudo, todas as emulsões testadas exibiram comportamento de espessamento por cisalhamento (pseudoplástico), como evidenciado pelos seus valores de N inferiores a 1,0. As nanopartículas reduziram efetivamente a tensão interfacial. As propriedades morfológicas e a concentração de nanocelulose tiveram um efeito significativo na capacidade de emulsificação. Sob a mesma dosagem de celulose, o CBNF exibiu a melhor capacidade de emulsificação.

4.6 Conclusão

Foi avaliado o uso potencial da nanocelulose bacteriana (nanocristais ou nanofibrilas) como estabilizador em emulsões Pickering com baixo teor de óleo. As nanofibrilas (CBNF) foram produzidas por desintegração mecânica de celulose bacteriana oxidada mediada por TEMPO e os nanocristais (NCCB) por hidrólise com ácido sulfúrico. Ambas as nanoceluloses exibiram alta carga superficial ($>|45|$ mV) e grande hidrofobicidade (ângulo de contato em torno de 30° para ambas). Após a produção das emulsões Pickering, observou-se o efeito das concentrações de nanocelulose e sal na tensão interfacial, tamanho, estabilidade e reologia. Ao aumentar a concentração de nanocelulose, a tensão interfacial é reduzida. Maior estabilidade foi observada para concentrações elevadas de sal e nanocelulose. Para emulsões estabilizadas por NCCB, uma menor concentração de celulose combinada com baixas concentrações de sal mostrou ser suficiente para a estabilização total das gotículas. Imagens de Cryo-SEM e microscopia confocal mostram a localização da nanocelulose na interface óleo-água. Do ponto de vista reológico, a adição de NaCl causa um aumento na viscosidade, que foi mais pronunciado nas amostras de CBNF. Esses resultados indicam que o uso de CBNF ou NCCB, juntamente com sal, permite ajustar as propriedades da emulsão para aplicações específicas, como a captura de gotículas de óleo em sistemas distintos projetados para a formulação de produtos alimentícios com baixo teor de gordura.

4.7 Referências

- AJKIDKARN, P.; MANUSPIYA, H. Novel bacterial cellulose nanocrystals/polyether block amide microporous membranes as separators for lithium-ion batteries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3580–3588, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.234>. Acesso em: 23 jul. 2024.
- ALBERT, C. *et al.* Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 309, p. 302–332, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.003>. Acesso em: 23 jan. 2024.
- ANDRADE, F. K. *et al.* Stable microfluidized bacterial cellulose suspension. **Cellulose**, v. 26, p. 5851–5864, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02512-y>. Acesso em: 23 jan. 2024.
- ANJALI, T. G.; BASAVARAJ, M. G. Influence of pH and salt concentration on Pickering emulsions stabilized by colloidal peanuts. **Langmuir**, v. 34, p. 13312–13321, 2018. Disponível

em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02913>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ARSERIM-UÇAR, D. K. *et al.* Characterization of bacterial cellulose nanocrystals: Effect of acid treatments and neutralization. **Food Chemistry**, v. 336, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127597>. Acesso em: 23 jan. 2024.

AZEREDO, H. M. C. *et al.* Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BAI, L. *et al.* Pickering emulsions by combining cellulose nanofibrils and nanocrystals: Phase behavior and depletion stabilization. **Green Chemistry**, v. 20, p. 1571–1582, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8gc00134k>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BAI, L. *et al.* Recent Advances in Food Emulsions and Engineering Foodstuffs Using Plant-Based Nanocelluloses. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 12, p. 383-406, 2021a. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-food-061920-123242>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BINKS, B. P.; LUMSDON, S. O. Effects of oil type and aqueous phase composition on oil–water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity. **Physical Chemistry Chemical Physics**, issue 13, 2000a. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b002582h>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BINKS, B. P.; LUMSDON, S. O. Influence of particle wettability on the type and stability of surfactant-free emulsions. **Langmuir**, v. 16, p. 8622–8631, 2000b. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la000189s>. Acesso em: 23 jan. 2024.

BOUGHRIBA, S. *et al.* pH sensitive composite hydrogels based on gelatin and reinforced with cellulose microcrystals: In depth physicochemical and microstructural analyses for controlled release of vitamin B2. **Materials Today Communications**, v. 27, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102334>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CAI, Z. *et al.* Correlation between interfacial layer properties and physical stability of food emulsions: current trends, challenges, strategies, and further perspectives. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 313, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102863>. Acesso em: 30 nov. 2024.

CHASSAING, B. *et al.* Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, p. 92–96, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14232>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CHENGLIN, Y. *et al.* Self-Assembly and Emulsification of Poly{[styrene-*alt*-maleic acid]-co-[styrene-*alt*-(N-3,4-dihydroxyphenylethyl-maleamic acid)]}. **Langmuir**, v. 28, p. 9211–9222, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la301605a>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CHUBERRE, B. *et al.* Mineral oils and waxes in cosmetics: an overview mainly based on the current European regulations and the safety profile of these compounds. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, p. 5–14, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/jdv.15946>. Acesso em: 30 nov. 2024.

CORNWELL, P. A. A review of shampoo surfactant technology: consumer benefits, raw materials and recent developments. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, issue 1, p. 16–30, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ics.12439>. Acesso em: 22 jan. 2023.

COURTENAY, J. C. *et al.* Salt-Responsive Pickering Emulsions Stabilized by Functionalized Cellulose Nanofibrils. **Langmuir**, v. 37, p. 6864–6873, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c03306>. Acesso em: 30 nov. 2024.

COX, S. *et al.* Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. **Nutrition Reviews**, v. 79, issue 6, p. 726–741, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa038>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DAI, H. *et al.* Recent advances on cellulose nanocrystals for Pickering emulsions: Development and challenge. **Trends in Food Science and Technology**, v. 102, p. 16–29, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.016>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DANIEL-DA-SILVA, A. L. *et al.* Synthesis and swelling behavior of temperature responsive κ -carrageenan nanogels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 355, p. 512–517, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.12.071>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DICKINSON, E. Particle-based stabilization of water-in-water emulsions containing mixed biopolymers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 31-40, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.004>. Acesso em: 30 nov. 2024.

DICKINSON, E.; GOLDING, M. Rheology of Sodium Caseinate Stabilized Oil-in-Water Emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 191, issue 1, p. 166-176, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.4939>. Acesso em: 30 nov. 2024.

FUJISAWA, S.; TOGAWA, E.; KURODA, K. Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions and their applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 18, p. 959–971, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14686996.2017.1401423>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GAO, Y. *et al.* Low oil Pickering emulsion gels stabilized by bacterial cellulose nanofiber/soybean protein isolate: An excellent fat replacer for ice cream. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 247, 2023b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125623>. Acesso em: 30 nov. 2024

GESTRANIUS, M. *et al.* Phase behaviour and droplet size of oil-in-water Pickering emulsions stabilised with plant-derived nanocellulosic materials. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 519, p. 60–70, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.04.025>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GOI, Y. *et al.* Dual Functions of TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers in Oil-in-Water Emulsions: A Pickering Emulsifier and a Unique Dispersion Stabilizer. **Langmuir**, v. 35, issue 33, p. 10920-10926, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01977>. Acesso em: 30 nov. 2024.

GUO, S. *et al.* Depletion effects and stabilization of Pickering emulsions prepared from a dual nanocellulose system. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 10, p. 9066–9076, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01059>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HEDAYATI, S. *et al.* Influence of pregelatinized and granular cold water swelling maize starches on stability and physicochemical properties of low fat oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 102, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105620>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HU, Y. *et al.* Pickering emulsions with enhanced storage stabilities by using hybrid β -cyclodextrin/short linear glucan nanoparticles as stabilizers. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115418>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JIA, Y. *et al.* Rheological behaviors of Pickering emulsions stabilized by TEMPO-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 215, p. 263–271, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.073>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JIA, Y. *et al.* Surfactant-free emulsions stabilized by tempo-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 907-915, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.099>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JIANG, Y. *et al.* Effects of sodium alginate on microstructural and properties of bacterial cellulose nanocrystal stabilized emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 607, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125474>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KALASHNIKOVA, I. *et al.* Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. **Soft Matter**, v. 9, p. 952–959, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c2sm26472b>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KALASHNIKOVA, I. *et al.* New Pickering Emulsions Stabilized by Bacterial Cellulose Nanocrystals. **Langmuir**, v. 27, issue 12, p. 7471-7449, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la200971f>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KEDZIOR, S. A. *et al.* Nanocellulose in emulsions and heterogeneous water-based polymer systems: A Review. **Advanced Materials**, v. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adma.202002404>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KHAN, H.; KADAM, A.; DUTT, D. Studies on bacterial cellulose produced by a novel strain of *Lactobacillus* genus. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115513>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KOSHANI, R.; MADADLOU, A. A viewpoint on the gastrointestinal fate of cellulose nanocrystals. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 268–273, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.023>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, M. *et al.* Cellulose nanoparticles: structure-morphology-rheology relationships. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 3, p. 821–832, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00144>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, Q. *et al.* Food-grade olive oil Pickering emulsions stabilized by starch/ β -cyclodextrin complex nanoparticles: Improved storage stability and regulatory effects on gut microbiota. **LWT**, v. 155, 2022a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112950>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LIU, B. *et al.* Inhibition of oil digestion in Pickering emulsions stabilized by oxidized cellulose nanofibrils for low-calorie food design. **RSC Advances**, v. 9, p. 14966–14973, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9ra02417d>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LIU, F.; TANG, C. H. Soy glycinin as food-grade Pickering stabilizers: Part. II. Improvement of emulsification and interfacial adsorption by electrostatic screening. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 620–630, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.10.024>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LIU, L. *et al.* Effect of counterion choice on the stability of cellulose nanocrystal Pickering emulsions. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 57, p. 7169–7180, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b01001>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LIU, Z. *et al.* Bacterial cellulose nanofibers improved the emulsifying capacity of soy protein isolate as a stabilizer for Pickering high internal-phase emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 112, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106279>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LOW, L. E. *et al.* Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties and stability of Pickering emulsion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 277, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102117>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARTINS, D. *et al.* A dry and fully dispersible bacterial cellulose formulation as a stabilizer for oil-in-water emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115657>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARUYAMA, S.; STRELETSKAYA, N. A.; LIM, J. Clean label: Why this ingredient but not that one? **Food Quality and Preference**, v. 87, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104062>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matters**, v. 8, p. 1719-1729, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MIKULCOVÁ, V. *et al.* On the stabilization of emulsions by cellulose nanocrystals and nanofibrils: Interfacial behavior and synergism. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 675, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.131975>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MING, L. *et al.* Evolution and critical roles of particle properties in Pickering emulsion: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 388, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122775>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MORAIS, J. P. S. *et al.* Sustainable Pickering Emulsions with Nanocellulose: Innovations and Challenges. **Foods**, v. 12, issue 19, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods12193599>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MOTA, R. *et al.* Tracking Bacterial Nanocellulose in Animal Tissues by Fluorescence Microscopy. **Nanomaterials**, v. 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano12152605>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MOUSTAFA, H.; NASR, H. E.; YOUSSEF, A. M. Development of antibacterial carboxymethyl cellulose/quaternized starch bionanocomposites based on cinnamon essential oil nanoemulsion for wound healing applications. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03403-2>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NAIMI, S. *et al.* Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. **Microbiome**, v. 9, n. 66, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00996-6>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NASCIMENTO, E. S. *et al.* TEMPO oxidation and high-speed blending as a combined approach to disassemble bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 26, p. 2291–2302, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2208-2>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PANDI, N.; SONAWANE, S. H.; KISHORE, K. A. Synthesis of cellulose nanocrystals (CNCs) from cotton using ultrasound-assisted acid hydrolysis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 70, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2020.105353>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PAXIMADA, P. *et al.* Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 225-232, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.003>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PEREIRA, A. L. S. *et al.* Bacterial cellulose aerogels: Influence of oxidation and silanization on mechanical and absorption properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116927>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PINTO, N. O. F. *et al.* Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial crops and products**, v. 86, p. 279-288, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.013>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RHODES, J. M. Nutrition and gut health: the impact of specific dietary components – it's not just five-a-day. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 89, issue 1, p. 9-18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0029665120000026>. Acesso em: 30 nov. 2023.

RODRIGUEZ, A. N. B.; BINKS, B. P. High internal phase Pickering emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 57, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101556>. Acesso em: 30 nov. 2024.

SAELICES, C. J.; CAPRON, I. Design of Pickering Micro- and Nanoemulsions Based on the Structural Characteristics of Nanocelluloses. **Biomacromolecules**, v. 19, issue 2, p. 460-469, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01564>. Acesso em: 23 jan. 2024.

SCHMITT, V.; DESTRIATS, M.; BACKOV, R. Colloidal particles as liquid dispersion stabilizer: Pickering emulsions and materials thereof. **Comptes Rendus. Physique**, v. 15, n. 8-9, p. 761-774, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2014.09.010>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SCHRÖDER, A. *et al.* Coalescence stability of Pickering emulsions produced with lipid particles: A microfluidic study. **Journal of Food Engineering**, v. 234, p. 63–72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.007>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SOMMER, A.; STAROSZCZYK, H. Bacterial cellulose vs. bacterial cellulose nanocrystals as stabilizer agents for O/W Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 145, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109080>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SUN, C.; GUNASEKARAN, S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 23, issue 1, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.006>. Acesso em: 30 nov. 2023.

TANG, M. *et al.* Rheological and structural properties of sodium caseinate as influenced by locust bean gum and κ -carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 112, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106251>. Acesso em: 30 nov. 2023.

THOMPSON, K. L. *et al.* Non-aqueous Isorefractive Pickering Emulsions. **Langmuir**, v. 31, p. 4373-4376, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00630>. Acesso em: 30 nov. 2023.

VARANASI, S. *et al.* Pickering emulsions electrostatically stabilized by cellulose nanocrystals. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. 409, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00409>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VASCONCELOS, N. F. *et al.* Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 425-431, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.090>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VIENNOIS, E. *et al.* Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive E. coli Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. **Cell Reports**, v. 33, issue 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108229>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WANG, D. *et al.* Fabrication and application of Pickering emulsion stabilized by high pressure homogenization modified longan shell nanofiber. **Journal of Food Engineering**, v. 339, 2023b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111264>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WONG, S. K. *et al.* Transforming the Chemical Functionality of Nanocellulose for Applications in Food Pickering Emulsions: a Critical Review. **Food Reviews International**, v. 40, issue 4, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2212034>. Acesso em: 22 nov. 2024.

WU, Y. *et al.* Effect of surface charge density of bacterial cellulose nanofibrils on the properties

of O/W Pickering emulsions co-stabilized with gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 138, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108447>. Acesso em: 22 jan. 2024.

WU, Y. *et al.* Effect of surface charge density of bacterial cellulose nanofibrils on the rheology property of O/W Pickering emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 120, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106944>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WU, Y. *et al.* Improvement of O/W emulsion performance by adjusting the interaction between gelatin and bacterial cellulose nanofibrils. **Carbohydrate Polymers**, v. 276, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118806>. Acesso em: 22 jan. 2023.

XU, Q. Y.; NAKAJIMA, M.; BINKS, B. P. Preparation of particle-stabilized oil-in-water emulsions with the microchannel emulsification method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 262, issues 1–3, p. 94–100, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.04.019>. Acesso em: 22 jan. 2023.

XU, W. *et al.* Rheological behavior and microstructure of Pickering emulsions based on different concentrations of gliadin/sodium caseinate nanoparticles. **European Food Research and Technology**, v. 247, p. 2621–2633, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03827-6>. Acesso em: 22 jan. 2023.

YAN, H. *et al.* Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil Pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 127–135, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZENG, C. *et al.* Self-constructed water-in-oil Pickering emulsions as a tool for increasing bioaccessibility of betulin. **Food Chemistry: X**, v. 21, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101056>. Acesso em: 22 nov. 2024.

ZHANG, H. *et al.* Physicochemical characteristics and emulsification properties of cellulose nanocrystals stabilized O/W Pickering emulsions with high -OSO₃- group. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 267–277, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.023>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHANG, K. *et al.* Modulating *in vitro* gastrointestinal digestion of nanocellulose-stabilized Pickering emulsions by altering particle surface charge. **Food Chemistry**, v. 434, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137521>. Acesso em: 30 nov. 2024.

ZHANG, S. *et al.* Gastrointestinal fate and fatty acid release of Pickering emulsions stabilized by mixtures of plant protein microgels + cellulose particles: an *in vitro* static digestion study. **Food Biophysics**, v. 18, p. 120–132, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11483-022-09756-5>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHAO, Y. *et al.* Application of different hydrocolloids as fat replacer in low-fat dairy products: Ice cream, yogurt and cheese. **Food Hydrocolloids**, v. 138, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108493>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHENG, Y. *et al.* Extraction and preparation of cellulose nanocrystal from Brewer's spent grain

and application in Pickering emulsions. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 31, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2024.100418>. Acesso em: 30 nov. 2024.

ZUPPOLINI, S. *et al.* Cellulose Amphiphilic Materials: Chemistry, Process and Applications. **Pharmaceutics**, v. 14, issue 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020386>. Acesso em: 22 jan. 2023.

CAPÍTULO 5: PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA

A crescente utilização de nanoestruturas de celulose, como nanocristais de celulose e celulose nanofibrilada, destaca-se pelas suas propriedades excepcionais, como alta resistência mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade. No entanto, os métodos convencionais de produção enfrentam desafios como o alto consumo de energia e impactos ambientais adversos. Este estudo investigou soluções mais sustentáveis para a produção dessas nanoceluloses, incluindo o uso de carboximetilcelulose (CMC) para facilitar o processo de obtenção de celulose nanofibrilada e a neutralização por NaOH para a produção de nanocristais de celulose, visando minimizar os impactos ambientais e otimizar a aplicação dessas nanoceluloses em emulsões Pickering. Além disso, os desempenhos desses materiais secos por pulverização também foram avaliados quanto à dispersibilidade e suas propriedades funcionais na capacidade de formação e estabilidade de emulsões Pickering óleo em água de grau alimentício.

5.1 Introdução

Comparada à biomassas lenhosas e resíduos agrícolas, nanoceluloses podem ser mais facilmente obtidos a partir de certas espécies bacterianas (LI et al., 2019; ZHAI et al., 2018; JIA et al. 2016). A celulose bacteriana compartilha a mesma fórmula molecular com as celuloses vegetais, no entanto é livre de lignina, hemiceluloses e pectina, o que torna a sua purificação um processo fácil e de baixa energia, enquanto a purificação de celuloses vegetais geralmente requer processos químicos severos ou moderados (AZEREDO et al., 2019; HUANG et al., 2014). Suas nanoestruturas isoladas (nanofibrilas ou nanocristais) são fáceis de combinar em formulações, e as proporções de componentes podem ser controladas com mais precisão para as diferentes aplicações, incluindo a utilização como estabilizadores Pickering (AZEREDO et al., 2019).

Os processos utilizando homogeneizador de alta pressão ou microfluidizador de alta pressão são considerados métodos mecânicos verdes bem estabelecidos, que têm sido amplamente empregados para produzir celulose nanofibrilada em larga escala ou em escala laboratorial. a redução no tamanho das fibrilas é alcançada por meio de forças intensas e alta energia, como cavitação, turbulência e cisalhamento, que ocorrem quando a mistura é forçada a passar por um pequeno orifício sob alta pressão. Na microfluidização a mistura é forçada a passar por microcanais de interação a altíssimas pressões, e as gotas são fragmentadas por forças de impacto, cisalhamento e cavitação, resultando em partículas menores e uma distribuição de tamanho mais uniforme (KARGARZADEH et al., 2017; MISSOUM et al, 2013). No entanto, limitações de alto consumo de energia e aglomeração das fibrilas estão comumente relacionadas nesses processos de produção de celulose nanofibrilada. Para superar essas limitações, pré-tratamentos foram propostos para resolver esse problema e facilitar a produção em escala (MISSOUM et al, 2013).

A oxidação mediada por 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO) é o pré-tratamento químico mais amplamente utilizado para obter celulose nanofibrilada (PRADHAN et al., 2022), sendo o procedimento mais simples e eficiente para a introdução de funcionalidades em fibras de celulose (MILANOVIC et al., 2020. O conteúdo de grupo carboxila adquiridos na oxidação mediada por TEMPO presente nas nanoceluloses fornece cargas superficiais negativas que ajudam a repelir as fibras umas das outras, prevenindo a agregação e conferindo estabilidade eletrostática à suspensão. As nanofibras de celulose obtidas

são de pequeno tamanho lateral, tornando possível fornecer dispersões quase transparentes e altamente viscosas (KALIA et al., 2014, SAITO et al., 2007). Essas características são importantes para manter as nanoceluloses dispersas em soluções, facilita a desfibrilação, a redução do tamanho das fibrilas e a sua aplicação (PATIL et al., 2021). Contudo, apresenta desvantagem com relação ao impacto ambiental, devido ao uso de reagentes halogenados; dificuldades na reciclagem (processos de circuito fechado) e o alto custo do reagente TEMPO. Uma preocupação mais séria surge do fato de que reagentes à base de haleto, por exemplo, hipoclorito de sódio e brometo de sódio, são usados como co-oxidantes (MILANOVIC et al., 2020; ZHANG et al., 2020; CARLSSON et al., 2014).

Enquanto para a obtenção de nanocristais de celulose o método mais utilizado é a hidrólise de ácidos inorgânicos fortes, pois é capaz de degradar a região amorfa da celulose, preservando a região cristalina (ZHANG et al., 2020). Esse método é fácil e rápido, e possui aplicação bem estabelecida em escala industrial, tendo sido comprovada como uma solução eficaz para a geração de nanocristais com alto grau de pureza (NOREMYLIA, et al., 2022). No entanto, a principal preocupação deste método é a água residual ácida gerada a partir do processo de lavagem, a fim de neutralizar o valor de pH da suspensão da nanocelulose. O processo de lavagem é geralmente realizado pela adição de água fria seguida de centrifugação e diálise até que o pH neutro seja atingido. Todo esse processo demanda o uso de elevado volume de água e, por consequência, a geração de águas residuais ácidas (FERNANDES et al., 2023; PHANTHONG et al., 2018).

Com isso, pesquisas continuam focando na otimização das técnicas existentes e no desenvolvimento de métodos mais sustentáveis, visando beneficiar o processo produtivo (SANCHEZ-SALVADOR et al., 2024 CHEN et al., 2022; MAZEGA et al., 2023; SERRA et al., 2017; SANCHEZ-SALVADOR et al., 2021; XU et al., 2022; XU et al., 2023; ZHANG et al., 2022). O objetivo desse estudo foi minimizar as principais questões relacionadas aos processos de obtenção da celulose nanofibrilada e nanocristais de celulose, projetando o uso em escala industrial. Nesse capítulo foram propostas produções mais sustentáveis, incluindo o uso de carboximetilcelulose (CMC) para facilitar o processo de obtenção de nanofibrilas e a neutralização por NaOH para a produção de nanocristais, que pode minimizar os impactos ambientais, e avaliar a aplicação em emulsões Pickering. O desempenho dos materiais secos em pó também foram avaliados.

5.2 Materiais e métodos

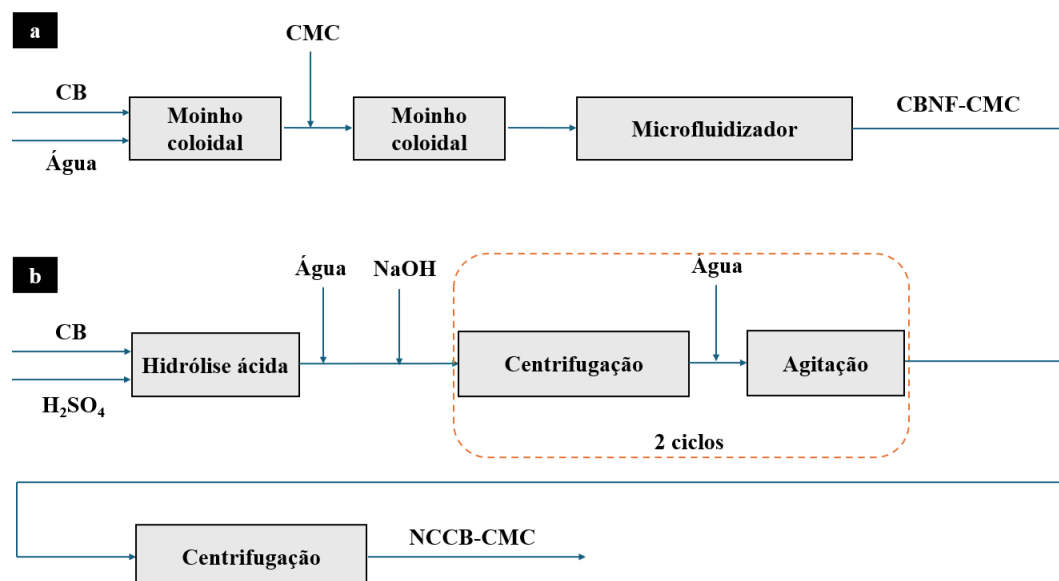
5.2.1 Materiais

Membranas de celulose bacteriana (BC) purificadas secas foram fornecidas pela Biosmart Nanotechnology Ltda (Brasil). Hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram obtidos da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) e usados sem purificação adicional e conforme recebidos do fornecedor. Carboximetilcelulose de sódio / Goma CMC comercial (MIX Ingredientes, Duas Rodas Industrial, São Paulo, Brasil) foi adquirido em um supermercado local (Ceará, Brasil). Cloreto de sódio (NaCl) foi obtido da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil).

5.2.2 Preparação das nanoceluloses bacteriana

A Figura 5.1 descreve os fluxogramas de produção de celulose nanofibrilada e de nanocristais de celulose pelos processos propostos que foram investigados no presente capítulo, para aplicação em emulsões pickerig: funcionalização por contato com CMC e microfluidização de alta pressão para obtenção de nanofibrilas e nanocristais de celulose obtidos por hidrólise com ácido sulfúrico, utilizando neutralização por NaOH.

Figura 5.1 (a) Fluxogramas da produção da celulose nanofibrilada e (b) nanocristais de celulose.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2.1 Preparação da celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF-CMC)

BC foi associada à CMC e nanofibrilada por microfluidização de alta pressão. O BC foi suspenso em água destilada (11,35g/L, base seca) e submetido a uma desconstrução inicial em moinho coloidal vibratório (Nova Meteor, REX - aço inox, São Paulo, Brasil), regime contínuo/sob circulação, por 1h30min, com distância entre dentes de $\frac{1}{4}$ de volta. O teor de sólidos da suspensão foi determinado gravimetricamente após secagem a 105 °C até peso constante. Separadamente, a CMC foi reconstituída em água destilada (12,91g/L) sob agitação e temperatura (60°C) constantes em agitador mecânico de hélice naval (propulsor de 3 lâminas) (Fisatom, 713DS, São Paulo, Brasil). BC inicialmente desconstruída foi misturada com a solução de CMC em uma razão de massa de 80:20 (CB:CMC) no moinho coloidal vibratório sob as mesmas condições iniciais, por 30 mins, para um teor final de sólidos de 1%. A mistura foi submetida à homogeneização utilizando um microfluidizador de alta pressão (Microfluidics, M-110EH, Westwood, MA, US) por 1, 5 ou 10 ciclos, pressão operacional de 20.000 psi e câmara Z de aberturas 200 e 100 micrômetros, resultando em CB nanofibrilada por associação com CMC (CBNF-CMC). A proporção CB-CMC foi determinada com base em testes prévios de aplicação em sistemas de emulsões óleo em água (pequena escala), considerando que a ausência de óleo ou creme na superfície da emulsão significava estabilidade da emulsão. A suspensão resultante foi armazenada em frascos reagentes a 4 °C.

5.2.2.2 Preparação dos nanocristais de celulose (NCCB-NaOH)

Nanocristais de celulose bacteriana (NCCB) foram preparados por hidrólise ácida conduzida a 45 °C por 60 min usando ácido sulfúrico a 60% (m/m). BC seca (10 g) foi agitada a 500-700 rpm (Fisatom, 713DS, São Paulo, Brasil) em 200 mL da solução ácida. No final do processo, a reação foi interrompida pela adição de uma solução de NaOH 4,5M (4°C) em uma proporção volumétrica de 1:6 (suspensão/água, v/v), até a neutralidade (pH 7) . A suspensão foi centrifugada (Hitachi - CR 22GIII) a 26.400×g por 15 min a 20 °C e o sobrenadante foi descartado. Água destilada foi adicionada até um volume suficiente para completa dispersão e a suspensão foi submetida a agitação mecânica (Fisatom, 713DS, São Paulo, Brasil) por 5 min a 500 rpm. A operação de centrifugação e agitação mecânica foi realizada duas vezes. Uma terceira centrifugação foi realizada, nas mesmas condições, e NCCB-NaOH foi recuperado com

o mínimo de água destilada possível. O número de lavagens e centrifugação foi determinada com base na redução do sal de sulfato de sódio em suspensão, até que a condutividade fosse menor que 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. (ZHANG et al, 2022). O teor de sólidos foi 3,4% (m/m), determinado gravimetricamente após secagem a 105 °C até um peso constante. A suspensão resultante foi armazenada a 4 °C.

5.2.3 Preparação de pó das suspensões de nanoceluloses por pulverização (spray dryer)

Na maioria dos casos, as nanoceluloses são processados como suspensões aquosas por causa de sua natureza hidrofílica e propensão a aglomerar durante a secagem (PENG et al., 2012; MARTINS et al., 2020a). Visando aplicação no mercado em escala, as matérias obtidas (CBNF-CMC; NCCB-NaOH) foram secas em pó utilizando equipamento de escala piloto, caracterizados e avaliados quanto aos seus desempenhos de reconstituição. As suspensões de nanocelulose obtidas foram dispersas para uma concentração de 0,5% m/m. Uma máquina de secagem por pulverização (Labmaq, MSD 3.0, São Paulo, Brasil) foi usada para preparar o pó das nanoceluloses. As condições de secagem foram: vazão de 2 L/h e temperatura de entrada de 130 °C, temperatura de saída 50°C, vazão de ar 2,3 m³/min. As nanoceluloses em pó preparadas foram coletadas e armazenadas em um recipiente hermético.

5.2.4 Caracterização das nanoceluloses

As nanoceluloses CBNF-CMC, NCCB-NaOH obtidas em suspensão ou em pós secos obtidos por pulverização foram avaliadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, medidas de potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raio-x e avaliadas comparativamente quanto às suas propriedades.

5.2.4.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Espectros de FTIR foram avaliados para verificar os grupos funcionais das nanoceluloses de CBNF-CMC e NCCB-NaOH devido ao processo de obtenção. Os espectros de FTIR foram registrados para os pós secos das nanoceluloses na forma de pastilhas de KBr contendo 5% (m/m), usando um espectrômetro Spectrum Two (Perkin Elmer, Waltham, EUA).

A resolução espectral foi de 4 cm^{-1} , 32 varreduras foram coletadas na faixa espectral de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, no modo de transmissão.

5.2.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A análise morfológica foi realizada usando um microscópio Tescan Vega 3 SBU (Tesca, República Tcheca), com um detector STEM sob uma tensão de aceleração de 30 kV. Suspensões diluídas das nanoceluloses (0,5% m/v) obtidas foram depositadas em grades individuais cobertas com Formvar, e o excesso de suspensão foi removido com papel absorvente. Após 3 min, gotas de ácido fosfotúngstico 1% (m/v) foram depositadas nas grades e removidas com papel absorvente. Pelo menos 10 campos do suporte de amostra foram visualizados. Os diâmetros ou comprimentos médios das nanofibrilas e nanocristais de 50 estruturas foram determinados usando o software ImageJ (National Institute of Health-NIH, América).

5.2.4.3 Medidas de potencial zeta

A estabilidade coloidal das suspensões de nanoceluloses (0,5% m/v) foi medida pelo potencial zeta, usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) com um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi usado um ajuste de ângulo de detecção de 173° , índice de refração 1,45, índice de dispersão 1,33, viscosidade 0,8872 cP e laser He-Ne (4 nW). A mobilidade eletroforética considerou a constante dielétrica da água de 78,5. O software Zetasizer (versão 7.03) foi aplicado para analisar os dados.

5.2.4.4 Difração de raio-X (DRX)

Os padrões DRX foram obtidos com um difratômetro para amostras policristalinas X'pert-Pro MPD (Panalytical, Eindhoven, Países Baixos), com um tubo de cobalto (Co) em 40 kV e 40 mA na escala de 2θ . O intervalo angular foi de $10\text{ a }30^{\circ}$, com uma velocidade de varredura de $0,5^{\circ}/\text{min}$. Os pós secos obtidos por puerização foram analisados diretamente.

O índice de cristalinidade (IC) foi calculado em função da intensidade máxima do pico de difração da região cristalina (I_{002}), e a intensidade mínima para a região amorfa (I_{am}),

pelo método proposto por Segal et al. (SEGAL et al, 1959), usando a equação (5.1). O tamanho do cristalito (CrS) refere-se à largura média do cristal (I_{002} neste caso) e foi calculado usando a equação (5.2), descrita por Scherrer et al. (SINGHSA et al., 2018).

$$CrI (\%) = \left[\frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \right] \cdot 100 \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$CrS (nm) = \left(\frac{K \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos \theta} \right) \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Em que I_{002} é a intensidade máxima do pico de difração para a região cristalina referente ao plano cristalográfico 002 (celulose I) e I_{am} é a intensidade da parte amorfa da amostra. K é um fator adimensional dependente do método usado para calcular a amplitude ($K = 0,94$ neste estudo), λ é o comprimento de onda do raio-X incidente ($1,788965 \text{ \AA}$), FWHM é a largura total na metade da altura do pico I_{002} , θ é o ângulo de Bragg referente ao pico I_{002} .

O índice de cristalinidade foi determinado utilizando o método matemático de Seagal em detrimento do método de deconvolução de picos. De acordo com French e Santiago Cintrón (2013), para cristalitos com dimensões superiores a 5 nm, os resultados obtidos por ambos os métodos são equivalentes (FRENCH; SANTIAGO CINTRÓN, 2013).

5.2.4.5 Avaliação da dispersibilidade

Para avaliar a dispersibilidade das nanoceluloses secas em pó (CBNF-CMC; NCCB-NaOH), suspensões foram preparadas a 0,5% (m/v em base seca) em água destilada, por três métodos:

- (1) Dispersão por agitação manual vigorosa por alguns segundo;
- (2) Baixo cisalhamento mecânico, usando uma placa de agitador magnético a 900 rpm, 45°C por 60 min;
- (3) Forças da cavitação acústica, usando um ultrassom de ponteira (Unique – Cell Disruptor, 60 Hz; 300 W) por 4 min.

As nanoceluloses redispersas foram armazenadas em frascos reagentes a 28°C , por 48h e avaliados quanto ao aspecto físico e existencia de instabilidade como precipitação e formação de agregados.

5.2.5 Preparação das emulsões Pickering óleo em água

As nanoceluloses foram aplicadas em sistemas de emulsões óleo em água como estabilizadores Pickering de grau alimentício. Todas as emulsões foram analisadas para determinar o tamanho médio das gotas e a morfologia. A estabilidade da emulsão foi avaliada por inspeção visual, considerando que a ausência de óleo ou creme na superfície da emulsão significa estabilidade da emulsão.

5.2.5.1 Preparação das emulsões Pickering

Emulsões com fração de óleo de girassol (10% v/v) foram preparadas pela combinação dos componentes CBNF-CMC ou NCCB-NaOH (1% v/v) com NaCl (50 mM) (LI et al., 2018). As emulsões foram emulsionadas usando um microfluidizador de alta pressão (Microfluidics, M-110EH, Westwood, MA, US) por 6 ciclos, pressão operacional de 20.000 psi e câmara Z de aberturas 200 e 100 micrômetros. E emulsões contendo NCCB-NaOH (1% v/v) com NaCl (50 mM) foram emulsionadas usando um ultrassom de ponteira (Sonifier 450, Branson Ultrasonics, Danbury, CT) por 4 min, com tempo de 1 min on/off e 60% de amplitude para cada emulsão.

5.2.5.2 Estabilidade das emulsões Pickering

A estabilidade das emulsões recém-preparadas ou após 30 dias de armazenamento em temperatura resfriada a 4°C foi monitorada (DAI et al., 2021). A estabilidade foi avaliada por microscopia óptica e por meio de inspeção visual da emulsão, considerado que a ausência de óleo ou creme na superfície da emulsão significa estabilidade da emulsão. As imagens das emulsões foram obtidas por microscópio óptico (ZEISS AXIO IMAGER A2) com câmera acoplada (ZEISS AxioCam Icc 5) em até 1h após a preparação das emulsões. Uma gota da emulsão foi pipetada em uma lâmina de vidro e suavemente espalhada na lâmina usando a ponta. O uso de lamínulas foi aplicado para aquisição de imagens. As amostras foram estudadas em ampliações de 5 ×, 20 × e 63 ×. O tamanho das gotas das emulsões foi medido a partir de imagens com ampliação de 63 × e analisado usando o software ImageJ (National Institute of

Health-NIH, América). De acordo com a teoria de Mie, as medições do tamanho das partículas foram relatadas como o diâmetro médio ponderado por área $D_{(3,2)}$ e calculadas conforme Eq. (4.1) (WU et al., 2022).

$$D_{(3,2)} = \frac{\sum n_i \times d_i^3}{\sum n_i \times d_i^2} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

onde N é o número de partículas com o diâmetro.

5.2.6 Citotoxicidade

A citotoxicidade das nanoceluloses foi avaliada de acordo com a norma internacional ISO 10993-12 pelo método indireto da resazurina descrito por (VASCONCELOS et al, 2020), no qual a viabilidade celular é medida após exposição das células às amostras em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1%, p/v). Para preparar os extratos, nanoceluloses secas em pó foram esterilizados em luz UV, a 16 °C por 20 mins. Em seguida, as amostras foram colocadas assepticamente em placa de poliestireno de 24 poços e 1 mL de Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 1% (v/v) de Penicilina-Estreptomicina foi adicionado em cada poço.

Células L929 (fibroblastos murinos) foram semeadas em meio DMEM suplementado a uma densidade de 1×10^4 células/poço na placa de poliestireno de 96 poços, seguido de incubação a 37°C (5% de CO₂ e 95% de umidade) por 24 h. Posteriormente, o meio de cultura foi removido dos poços e 100 µL das amostras foram adicionados a cada poço e a placa foi novamente incubada a 37 °C por 24 ou 48 h.

Após esse período, a amostra foi removida dos poços e adicionados 120 µL de meio DMEM suplementado contendo o reagente resazurina (25 mg/L) e a placa foi incubada por 4 h em condições de cultivo padrão. Em seguida, 100 µL do meio contendo a resazurina metabolizada foi transferida para uma nova placa de 96 poços e medido em um leitor de microplacas (SpectraMax i3x, Molecular Device, Sunnyvale, EUA) no modo de fluorescência (λ excitação = 560 nm e λ emissão = 590 nm). Os grupos de controle negativo e positivo foram realizados expondo as células apenas ao meio de cultura DMEM suplementado e ao meio de cultura contendo 40% de DMSO, respectivamente. A viabilidade celular do grupo de controle

negativo foi assumida como 100%.

5.3 Resultados e Discussão

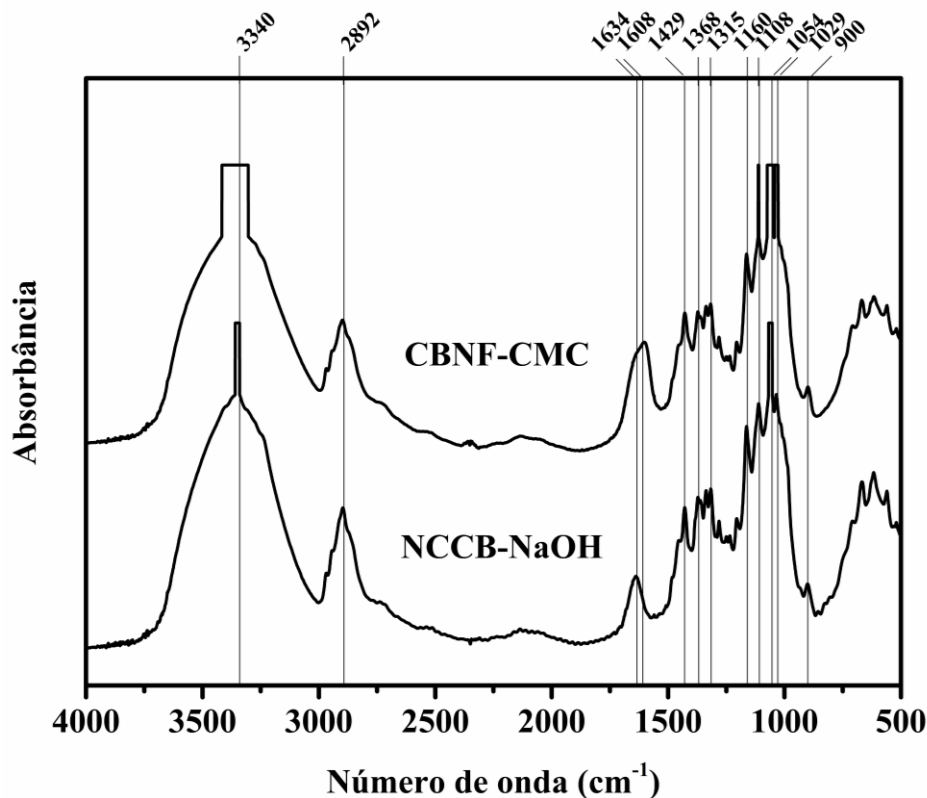
5.3.1 Caracterização das nanoceluloses

Na discussão dos resultados foi feita uma análise das nanoceluloses CBNF-CMC e NCCB-NaOH para avaliar os efeitos das rotas de processamento em suas propriedades. A discussão integrou os dados deste capítulo com os do Capítulo 3, onde foram abordadas as versões de CBNF e NCCB obtidas de processamentos convencionais, comparando suas vantagens, limitações e aplicações. Isso permitirá uma compreensão mais clara sobre o impacto do processamento nas propriedades finais das nanoceluloses e seu potencial de uso.

5.3.1.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR permitiram verificar que não houve alterações nos grupos funcionais das nanoceluloses devido ao processo de obtenção, apresentando bandas típicas presentes na CB. A Figura 5.2 mostra os espectros de FTIR para as nanoceluloses CBNF-CMC e NCCB-NaOH, destacando em linhas verticais as bandas de vibração correspondentes à estrutura química da celulose. A região com comprimento de onda em torno de 3340 cm^{-1} corresponde à frequência de alongamento dos grupos -OH típicos na celulose I (CASABURI et al., 2018). A banda em 2892 cm^{-1} foi atribuída ao alongamento aos grupos C-H₂ e C-H₃ ou vibrações de alongamento assimétricas e simétricas de CH₂ comuns em fibras de celulose. A bandas característica em torno de 1429 cm^{-1} e 1368 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular assimétrica das ligações C-H e deformações angular simétrica de C-H, respectivamente. Bandas de absorção em torno de 1315 cm^{-1} foi atribuído à deformações de O-H (GUIMARÃES et al., 2023).

Figura 5.2 Espectros FTIR de CBNF-CMC e NCCB-NaOH



Fonte: Elaborado pelo autor.

A absorção em 1160 cm^{-1} foi atribuído ao alongamento assimétrico das ligações glicosídicas C-O-C e ao estiramento simétrico C-O, respectivamente. As frequências observadas entre 1108 cm^{-1} e 1054 cm^{-1} foi devido às ligações C-OH e C-C-OH em álcoois secundários e primários, respectivamente (AJKIDKARN & MANUSPIYA, 2020; VASCONCELOS et al., 2017). A banda em torno de 1029 cm^{-1} corresponde ao alongamento C-O e uma vibração da celulose amorfa, resultante do alongamento do anel de glicose, produziu uma banda em torno de 900 cm^{-1} (DO NASCIMENTO et al., 2019). A banda de absorção em torno de 900 cm^{-1} está associada às ligações glicosídicas, que conectam as unidades de glicose na estrutura da celulose. Após a microfluidização de alta pressão ou hidrólise ácida, essa banda se torna mais proeminente, o que indica que houve um aumento na concentração de celulose cristalina. Esse aumento é um sinal de que as regiões amorfas da celulose foram removidas, permanecendo uma estrutura mais pura e rica em celulose cristalina, típica de nanoceluloses (MAITI et al., 2013).

No espectro CBNF-CMC, mostra uma banda de absorção adicional centrada em 1608 cm^{-1} , atribuída à vibração de alongamento dos grupos COO^- , o que confirma a presença de grupos carboxilato introduzidos pela associação da CMC à celulose bacteriana nanofibrilada (INDRARTE et al., 2016; CASABURI et al., 2018). Esse grupo também é introduzido na oxidação mediada por TEMPO (ZHANG et al., 2016) e tem a função de estabelecer cargas que facilitam o processamento e aplicação da celulose nanofibrilada (PATIL et al., 2021). Nenhuma outra banda é observada no espectro CBNF-CMC, um resultado esperado para uma mistura física sem interações químicas entre os polímeros.

No espectro FTIR de NCCB-NaOH, a banda em 1634 cm^{-1} foi atribuída ao modo de flexão de água absorvida (ANDRADE et al., 2019). Em contraste, a banda em 807 cm^{-1} (ligações vibratórias simétricas de ligações C-O-S de grupos C-O-SO_3^-) resultante da esterificação de H_2SO_4 na reação de hidrólise ácida em NCCB não foi detectada devido à pequena quantidade de grupos sulfato ligados à vibração (AJKIDKARN & MANUSPIYA, 2020; ARSERIM-UÇAR et al., 2021; VASCONCELOS et al., 2017).

Os espectros de FTIR das nanoceluloses CBNF-CMC e NCCB-NaOH foram semelhantes aos obtidos por seus pares utilizando os processos mais convencionais, celulose nanofibrilada obtida usando oxidação TEMPO e nanocristais neutralizadas por membrana de diálise (PINTO et al., 2024), enfatizando que os processos propostos não modificaram a estrutura química do biopolímero. Isso indica um potencial de aplicação direcionado para emulsões Pickering, assim como alcançado na investigação realizada no Capítulo 4.

5.3.1.2 Tamanho, morfologia e potencial zeta

5.3.1.2.1 Celulose bacteriana nanofibrilada (NFCB-CMC)

A desfibrilação mecânica inicial da celulose bacteriana em moinho coloidal resultou em uma suspensão com partículas menores, que foram vistas à olho nu. Comparada com os métodos de moagem a seco, a homogeneização úmida no moinho coloidal, tem um impacto mais significativo, pois a água facilita a quebra das ligações de hidrogênio na celulose (LI et al., 2021). Quebrar as ligações de hidrogênio expõe grupos mais funcionais, afetando as propriedades macroscópicas das fibras.

A adição da CMC reduziu a agregação das moléculas de celulose, devido às cargas superficiais dos grupos carboxilato, o que tornou a suspensão mais homogênea e fluida. A

hidratação proporcionada pela CMC causou um aumento no tamanho das fibrilas, apesar de as cargas carboxílicas evitarem a agregação. Como resultado, a CB após a desintegração inicial apresentou um tamanho médio menor ($57,96 \pm 17,89$ nm) do que após a adição de CMC ($68,85 \pm 14,48$ nm) (Tabela 5.1). Apesar do aumento no tamanho das fibrilas com CMC, a distribuição de tamanho foi mais uniforme, confirmando a maior homogeneidade da suspensão (Fig 5.3).

Tabela 5.1 – Tamanhos de diâmetros médios das fibras obtidas no processo de obtenção da celulose nanofibrilada.

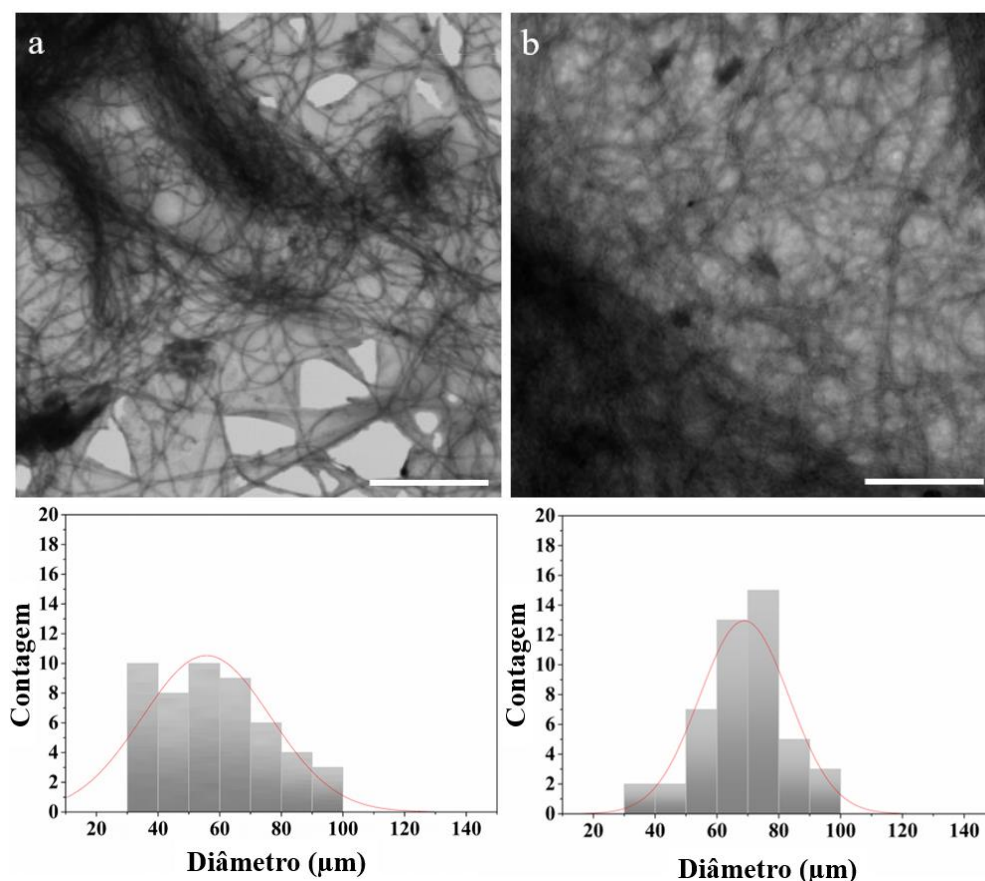
Etapas de processamento	Produto	Diâmetro médio (nm)	Mín (nm)	Máx (nm)
Moinho coloidal (1h30min)	CB	$57,96 \pm 17,89$	31,66	94,97
Moinho coloidal (30min)		$68,85 \pm 14,48$	34,94	97,89
Microfluidização (1 ciclo)	CB+CMC	$82,52 \pm 12,32$	47,3	120,3
Microfluidização (5 ciclos)		$73,97 \pm 10,97$	50,72	94,48
Microfluidização (10 ciclos)		$44,57 \pm 7,69$	27,15	65,26

Fonte: Elaborado pelo autor.

As imagens das estruturas de amostras de CB moídas são mostradas em detalhes na Figura 5.3. Durante a moagem as ligações de hidrogênio foram parcialmente quebradas, originando estruturas de rede fibrosa de celulose, com fibras em escala nanométricas. Uma rede de fibras alongadas mais homogênea foi observada após a moagem da CB com a CMC, consistente com os resultados da análise do tamanho das fibras, embora pontos de agregação se fizessem presentes em ambas as amostras.

A agregação das fibras pode ser explicada pelas forças de depleção. Em suspensões coloidais com fibras grandes, as forças de depleção surgem devido a interações estéricas, que são interações físicas entre as superfícies das partículas que restringem o movimento das moléculas ao redor delas. Isso pode levar à aproximação das partículas e, eventualmente, à sua agregação, ou seja, à formação de aglomerados (SOUZA et al., 2019). As forças repulsivas, devido às cargas na superfície das fibras com CMC, ajudam a separá-las, embora sejam novamente contrabalançadas pelas forças de depleção.

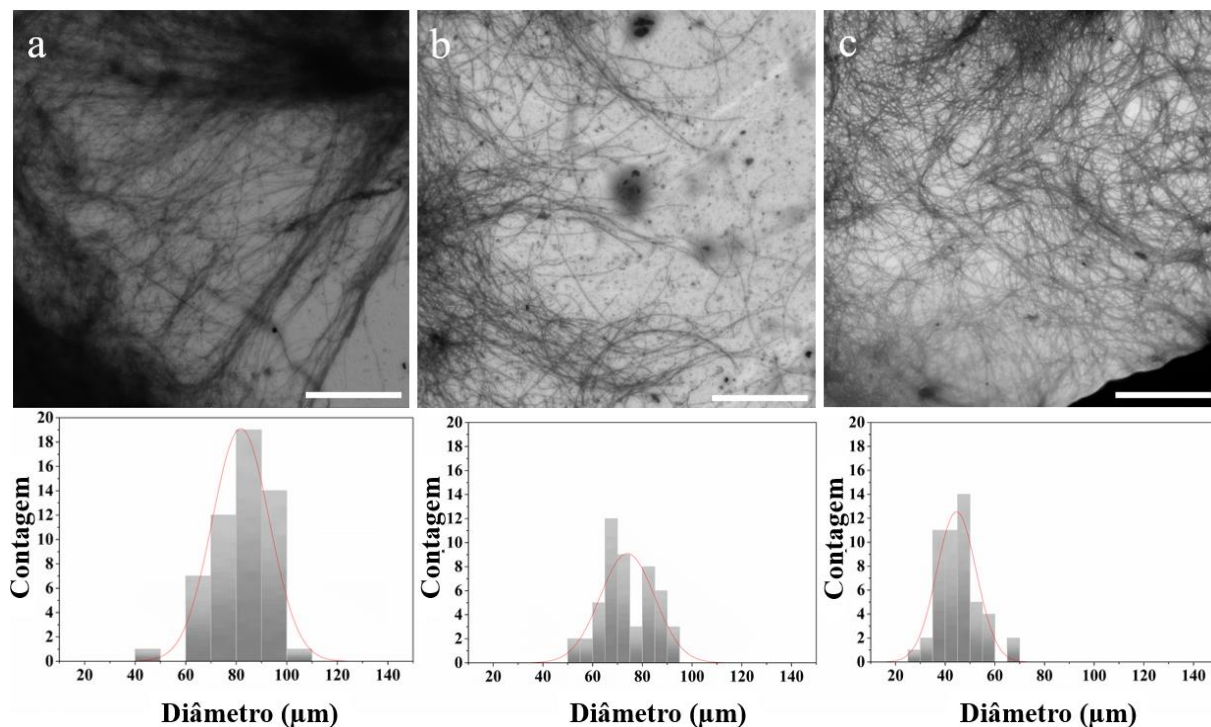
Figura 5.3 Imagens MET e histograma de frequência da distribuição das fibrilas de CB após desintegração em moinho coloidal antes (a) e após a adição de CMC (b). A barra de escala é de 25 μm



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o processamento em moinho coloidal, investigou-se o efeito do número de ciclos de microfluidização no tamanho das fibras na mistura CB-CMC. O número de ciclos influenciou o grau de fragmentação ou desagregação das fibras. Após um ciclo de microfluidização, a distribuição de tamanho das fibras se tornou mais estreita (Fig. 5.4), mas com um tamanho médio maior ($82,52 \pm 12,32 \text{ nm}$) do que o obtido na moagem inicial. Isso ocorreu porque as cargas carboxilato da CMC nas superfícies da CB contribuíram para a hidratação e inchamento das fibras (MARTINS et al., 2020b). No entanto, à medida que a microfluidização continuava, a força de cisalhamento e a pressão fragmentaram as fibrilas, resultando em uma redução no tamanho das mesmas após cinco e dez ciclos, formando nanofibrilas com tamanhos médios de $73,97 \pm 10,97 \text{ nm}$ e $44,57 \pm 7,69 \text{ nm}$, respectivamente (Tabela 5.1).

Figura 5.4 Imagens MET e histograma de frequência da distribuição dos tamanhos das fibrilas de CB após 1 ciclo (a), 5 ciclos (b) ou 10 ciclos de desintegração em microfluidizador. A barra de escala é de 10 μm



Fonte: Elaborado pelo autor.

À medida que o número de ciclos de microfluidização aumentou, as distribuições de tamanho das nanofibrilas deslocaram-se para faixas menores (Fig. 5.4), resultando em um pico proeminente entre 30 e 70 nm após 10 ciclos. Os tamanhos obtidos neste processo são comparáveis aos da celulose nanofibrilada por oxidação TEMPO, com tamanho médio de 61 ± 16 nm, variando de 25 a 146 nm. Notavelmente, a faixa obtida sem a oxidação mediada por TEMPO foi ainda menor, destacando a eficiência do sistema CB-CMC com 10 ciclos de microfluidização como a condição ideal para redução do tamanho das fibrilas. A estabilidade coloidal da celulose bacteriana nanofibrilada obtida tanto por oxidação TEMPO (-47mV) quanto por associação da CMC em processo de microfluidização (-110mV) foi medida pelo potencial zeta com valores acima de $|30|$ mV, destacando-se como altamente estáveis (MALVERN, 2024).

Além disso, as imagens de MET na Figura 5.4 mostram os feixes de fibrilas de celulose durante os ciclos de microfluidização. Após o primeiro ciclo é possível observar uma rede nanofibrilar 3D densa de fibras emergindo de um núcleo profundamente emaranhado. Mas após o quinto ciclo de microfluidização esses feixes apresentam uma estrutura com ramos de

fibras mais soltas. Com o aumento do tempo de cisalhamento (número de ciclos) de microfluidização o tamanho dos feixes diminui e uma rede mais frouxa das fibrilas se tornaram mais evidentes, tornando o núcleo menos denso. Essa estrutura tridimensional interconectada é chamada de rede percolante. A formação de redes percolantes no interior das emulsões pode encapsular e estabilizar as gotículas de óleo, prevenindo que elas coalesçam. Além disso, essas redes podem aumentar a viscosidade do sistema, dificultando a movimentação das gotículas e, consequentemente, melhorando a estabilidade física da emulsão (LU et al., 2021).

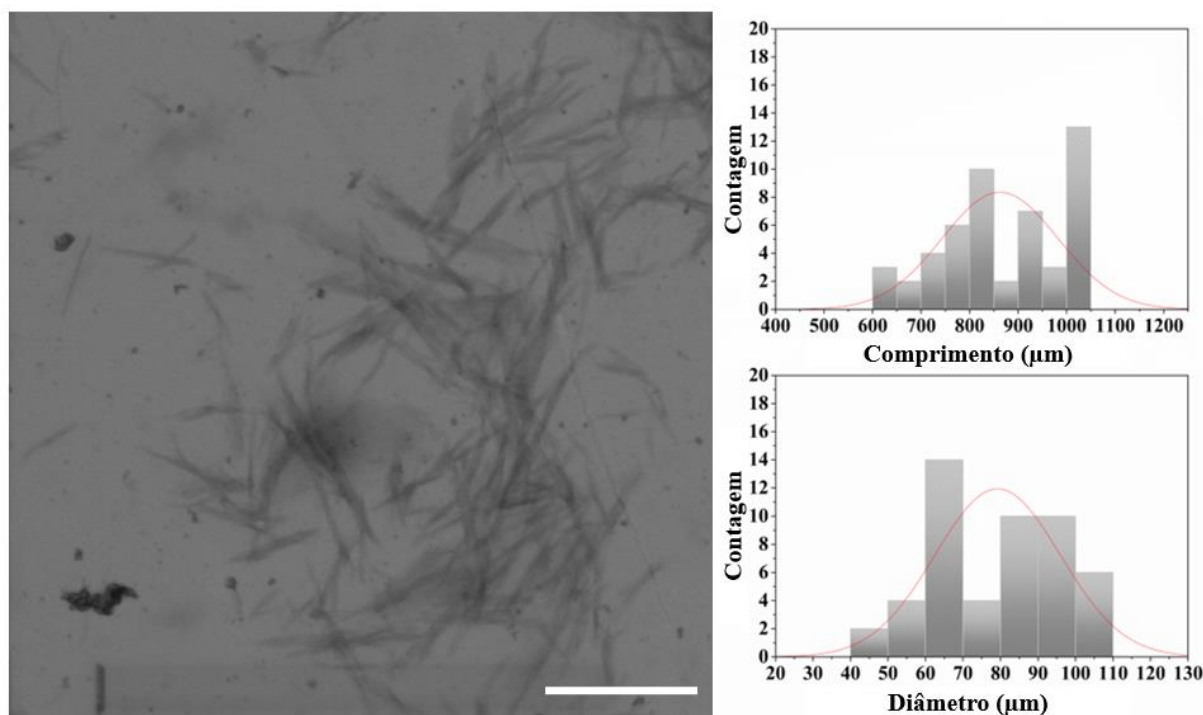
Um sistema CB:CMC também foi investigado anteriormente, visando obter CB seca redispersível (MARTINS et al., 2020b). A desfibrilação da CB ocorreu separado da CMC, utilizando dois métodos diferentes de homogeneização úmida sequencialmente, para desintegração da celulose bacteriana: um homogeneizador mixer empregando ação mecânica de lâminas de fiação de alto cisalhamento (1 min), seguido de homogeneizador de alta pressão (até 6 ciclos). Todos os tamanhos encontrados foram em escala micrométrica (52-43 μm). Foi relatado a diminuição do tamanho dos feixes com ramos menos evidentes, porém com densos núcleos de emaranhados de fibras. Isso foi atribuído aos ciclos de compressão e descompressão do homogeneizador de alta pressão. Ao final do processo uma solução de CMC foi adicionada na suspensão de CB desconstruída na proporção de 1:1, para um teor de sólidos de 2%, e posterior secagem. Na investigação atual, propomos o processamento de CB e CMC simultaneamente, usando um homogeneizador moinho coloidal e microfluidizador de alta pressão. A CMC atuou positivamente para uma desconstrução e redução das fibrilas de celulose em escala nanométrica. A hidratação da CB na presença de CMC contribuiu para uma redução efetiva em escala de menor magnitude, além de poder atuar na redução de aglomerados durante a secagem e tornar a CB redispersível. Além disso, a microfluidização demonstrou ser eficaz para reduzir os densos núcleos de emaranhados de fibras, pois combina a microfluidização e a pressão ultra-alta (XU et al., 2022). Mas, ao contrário de um homogeneizador operando a pressão constante, um microfluidizador funciona a uma taxa de cisalhamento constante, evitando a formação de densos núcleos de emaranhados de fibras pelos ciclos de compressão e descompressão do homogeneizador de alta pressão. Nesta investigação, a celulose nanofibrilada obtida com 10 ciclos foi a utilizada para caracterização e aplicação nos sistemas de emulsões Pickering.

5.3.1.2.2 Nanocristais de celulose bacteriana (NCCB-NaOH)

A hidrólise sulfúrica da celulose bacteriana resultou em nanocristais com comprimentos variando entre 609,1 nm e 1 μ m e diâmetros entre 48 e 108,8 nm. O comprimento médio dos nanocristais foi de $862,69 \pm 119,5$ nm, e o diâmetro médio foi de $79,22 \pm 16,71$ nm, correspondendo uma razão de aspecto (C/D) de 10,89. Esses nanocristais apresentaram dimensões maiores do que os obtidos anteriormente (Capítulo 4), devido à redução de 33% no tempo de hidrólise, que foi ajustado para 1 hora nesta investigação. A Figura 5.5 mostra a imagem MET dos nanocristais a distribuição de frequência das dimensões dos nanocristais obtidos.

Nos estágios iniciais da reação de hidrólise, o ácido difunde preferencialmente nas regiões não cristalinas da celulose, hidrolisando as ligações glicosídicas mais acessíveis. Depois que essas regiões mais acessíveis ao ataque ácido foram hidrolisadas, mais reações ocorrem, porém mais lentamente, atacando a extremidade redutora da celulose e a superfície das regiões cristalinas, onde os nanocristais se formam. Nesse ponto, o decréscimo no tamanho dos nanocristais está diretamente relacionada ao tempo de hidrólise, quando consideramos todas as outras condições do processo, como concentração de ácido, proporção ácido/celulose, agitação e temperatura, constantes (LIMA et al., 2015). Em geral, a redução do tempo de hidrólise é benéfica para o tempo de processo, porém o efeito dos tamanhos e proporções das nanoceluloses é um fator importante quando os cristais de celulose são usados como um agente de reforço em matrizes poliméricas (TRINH et al., 2018) e para a formação de emulsões de Pickering para estabilizar as interfaces óleo-água (JIA et al., 2019).

Figura 5.5 Imagem MET e histogramas de frequência da distribuição dos tamanhos dos nanocristais neutralizadas por NaOH. A barra de escala é de 2 μm



Fonte: Elaborado pelo autor.

Outras investigações com hidrólise de ácido sulfúrico de celulose bacteriana são relatadas apresentando dimensões semelhantes as encontradas, ainda que em diferentes condições de processamento (ARSERIM-UÇAR et al., 2021; VASCONCELOS et al., 2017; KALASHNIKOVA et al., 2013).

Os nanocristais obtidos utilizando a neutralização por NaOH tiveram um rendimento de 79%, baseado no peso seco inicial da CB, em conformidade com outros rendimentos relatados (VASCONCELOS et al., 2017). A aparência final da suspensão de NCCB-NaOH foi uma dispersão estável de aspecto turvo homogêneo, semelhante aos nanocristais obtidos anteriormente, por neutralização por diálise. Aparência semelhante também foi relatada para suspensão de nanocristais (1%) obtida de celulose vegetal pura (LI et al., 2015). A estabilidade coloidal, foi medida pelo potencial zeta foi de $-44,4 \pm 2,9$ mV. O potencial zeta da suspensão de nanocristais neutralizada por diálise anteriormente foi ligeiramente maior em módulo (-50mV). Em condições semelhantes de hidrólise à presente investigação (H_2SO_4 60%, 60 min, 45°C , proporção 1/100 CB/ H_2SO_4), realizada por Vasconcelos et al., nanocristais de celulose bacteriana obtiveram potencial zeta de

$-53.6 \pm 0.7\text{mV}$, também acima do valor obtido (VASCONCELOS et al., 2017).

Essas diferenças de potencial zeta podem ser consequência de uma neutralização parcial das cargas superficiais na presença de sulfato de sódio. Durante o processo de neutralização o ácido sulfúrico reage com o hidróxido de sódio, resultando na formação de sulfato de sódio e água. O sal sulfato de sódio tem o seu uso regulado como aditivo alimentar e reconhecido como seguro pela Food and Drug Administration – FDA e pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos – AESA. Porém os íons sulfato do sulfato de sódio podem reduzir a carga superficial dos nanocristais, que são carregados com grupos éster sulfato durante a hidrólise com ácido sulfúrico. Isso acontece porque íons sulfato, que são carregados negativamente, podem interagir com as regiões carregadas positivamente na superfície dos nanocristais. Essa interação pode ter levado a uma redução da carga superficial, refletindo em um menor valor do potencial zeta, porém sem afetar a estabilidade e dispersão dos nanocristais em solução.

5.3.1.3 Difração de raio-X (DRX)

Os fatores que influenciam o índice de cristalinidade e o tamanho do cristalito em nanofibrilas de celulose e nanocristais de celulose podem variar com base em aspectos do processo de obtenção, bem como nas propriedades intrínsecas da celulose (DAICHO et al., 2018; GEORGE; SABAPATHI, 2015). A análise de difração de raios X foi realizada para determinar a cristalinidade e o tamanho dos cristalitos da celulose bacteriana após os diferentes processos de obtenção e secagem das suspensões de nanoceluloses CBNF-CMC e NCCB-NaOH. Os valores de índice de cristalinidade e o tamanho dos cristalitos da CB após processamento de obtenção de CBNF-CMC e NCCB-NaOH estão incluídos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Índice de cristalinidade e tamanho do cristalito de CBNF-CMC e NCCB-NaOH.

	CrI (%)	CrS (nm)
CBNF-CMC	85.36 ± 0.56	8.88 ± 0.01
NCCB-NaOH	82.51 ± 0.71	8.33 ± 0.01

Fonte: Elaborada pelo autor.

Anteriormente, os índices de cristalinidade da celulose bacteriana foram relatados para avaliar o efeito de uma sequência de tratamentos para obter celulose bacteriana nanofibrilada. Foram investigadas amostras da celulose bacteriana não tratada; celulose oxidada por TEMPO e celulose oxidada TEMPO nanofibrilada, resultando nos seguintes índices de cristalinidade: 79%; 91% e 92%, respectivamente (NASCIMENTO, et al., 2019). O maior índice de cristalinidade foi alcançado após nanofibrilação da celulose oxidada TEMPO. Efeito semelhante foi observado após o processamento de nanofibrilação em microfluidizador para obter CBNF-CMC, resultando em um valor superior ao reportado da celulose bacteriana não tratada reportada por Nascimento et al. (2019). O aumento do índice de cristalinidade indica que o processamento foi efetivo na redução do tamanho das fibrilas (conteúdo amorfo) e exposição de uma maior proporção de regiões ordenadas (conteúdo cristalino), o que impacta diretamente suas propriedades físicas, como rigidez, resistência térmica e capacidade de absorção de água (PINKERT; MARSH; PANG, 2010).

O tamanho do cristalito de películas de celulose bacteriana foi avaliado em outro trabalho e compara diferentes níveis de processamento para obter celulose bacteriana nanofibrilada. O efeito do uso sequencial de diferentes câmaras de abertura operacionais de microfluidização foram avaliados (400, 100 e 87 μm). O tamanho do cristalito reduziu de $5,8 \pm 0,16$ nm para $4,4 \pm 0,1$ nm, à medida que o tempo de exposição ao processamento aumentou (número de ciclos) ou era mais intenso (menor câmara de abertura). Como resultado, a cristalinidade também reduziu ($86 \pm 0,33$ para $75 \pm 0,46$ %) (ANDRADE et al., 2019). Diferente do resultado de Nascimento et al (2019) relatado para a nanofibrila oxidada, em que a cristalinidade aumentou gradualmente à medida que a celulose foi nanofibrilada (NASCIMENTO, et al., 2019). O pré-tratamento da celulose por oxidação TEMPO modifica seletivamente o polímero sob condições aquosas suaves. O processo modifica os grupos hidroxila ligados a um carbono primário (C6) em grupos aldeído e então em carboxilato, enfraquecendo as ligações de hidrogênio, facilitando a desintegração mecânica. As forças repulsivas entre os carboxilatos ionizados superam as ligações de hidrogênio que mantêm as fibras unidas, permitindo que as nanofibrilas dentro das fibras se separem umas das outras de forma mais eficaz (EMENIKE et al. 2023; EINHORN et al., 2010). Neste caso, uma etapa de processamento mecânico mais suave é suficiente para obter a celulose nanofibrilada (ISOGAI; ZHOU, 2019).

Por outro lado, na obtenção de nanoceluloses por desintegração mecânica, a quebra

das moléculas não ocorre de forma seletiva. A celulose bacteriana se apresenta como uma rede tridimensional emaranhada, em que as forças de cisalhamento e pressão atuam em toda a dimensão das fibrilas. E, embora as regiões desordenadas (amorfas) sejam mais susceptíveis à quebra, pode haver também a descamação do conteúdo cristalino superficial, dependendo da intensidade de força de cisalhamento e pressão aplicadas (SURYANTO et al., 2021; EYHOLZER et al., 2010; AZMI et al., 2023). Isso reflete na obtenção de nanoceluloses com menor tamanho de cristalito e consequentemente, menor índice de cristalinidade (GHASEMI; BEHROOZ; GHASEMI, 2016).

O índice de cristalinidade obtido no processo atual ($85.36 \pm 0.56 \mu\text{m}$), usando CMC e microfluidizador, foi menor que o obtido pelo método convencional de oxidação (92%) (NASCIMENTO, et al., 2019), porém maior do que outros resultados relatados após nanofibrilação mecânica. Celulose bacteriana obtida por homogeneizador de alta pressão, aplicando pressão de 600 bar ($\sim 8702,28 \text{ psi}$), resultou em celulose nanofibrila com índice de cristalinidade de 70% (MUHAJIR et al., 2022). Outro estudo usando homogeneizador de alta pressão para processar celulose bacteriana a 150 bar ($\sim 2175,57 \text{ psi}$) em 10 ciclos, obteve celulose nanofibrilada com índice de cristalinidade de 81% (SURYANTO et al., 2021). Enquanto a celulose nanofibrilada derivada de polpa de linter obtida por moagem ultrafina apresentou índice de cristalinidade de 62% (GHASEMI; BEHROOZ; GHASEMI, 2016).

Comparado ao trabalho anterior usando processo de microfluidização da celulose bacteriana (máx. 60 ciclos) (ANDRADE et al., 2019), o processo atualmente proposto requereu menor tempo de processo (10 ciclos), para alcançar tamanho de celulose nanofibrilada próximo ($30 \pm 7 \text{ nm}$) ao obtido nesta investigação ($44,57 \pm 7,69 \text{ nm}$). Isso pode ser explicado pela presença dos grupos carregados da CMC introduzidos, que propõe uma espécie de funcionalização por contato da nanofibrila de celulose. Os grupos carboxilato da CMC geram forças repulsivas que, por sua vez, podem enfraquecer a rede de ligação de hidrogênio entre as cadeias de celulose. Além disso, a água que penetra nas fibras, fazendo com que inchem, reduz a pressão osmótica entre as fibras carregadas e o meio de dispersão. Como resultado, as ligações intermoleculares das fibras de celulose também podem se tornar enfraquecidas e a interrupção das paredes celulares é facilitada, de forma semelhante ao que ocorre na nanofibrilação pelos métodos de pré-tratamentos químicos, como na oxidação mediado por TEMPO (ALMEIDA et al., 2023).

Os nanocristais NCCB-NaOH apresentaram menor índice de cristalinidade comparado ao CBNF-CMC, com menor tamanho de cristalito. Não é comum encontrar um

índice de cristalinidade maior em nanofibrilas do que em nanocristais, pois, em geral, os nanocristais possuem uma estrutura mais ordenada e maior proporção de regiões cristalinas. Durante a produção de nanocristais, as regiões amorfas da celulose são removidas, deixando principalmente as áreas cristalinas. Já as nanofibrilas, embora possuam uma alta cristalinidade, ainda mantêm uma maior proporção de regiões amorfas. Contudo, neste caso, o método mecânico de nanofibrilação proporcionou uma remoção parcial de conteúdo amorfo da CBNF-CMC, com pequena quebra do conteúdo cristalino, conforme mencionado anteriormente. Porém, durante a hidrólise com ácido sulfúrico a quebra do conteúdo cristalino ocorreu em maior proporção, que refletiu em uma maior redução do tamanho do cristalito e índice de cristalinidade. Isso pode ocorrer devido a condições mais severas de hidrólise (maior concentração do ácido ou tempo de exposição de hidrólise), resultando em uma provável alteração na orientação das cadeias de celulose (VASCONCELOS et al., 2017).

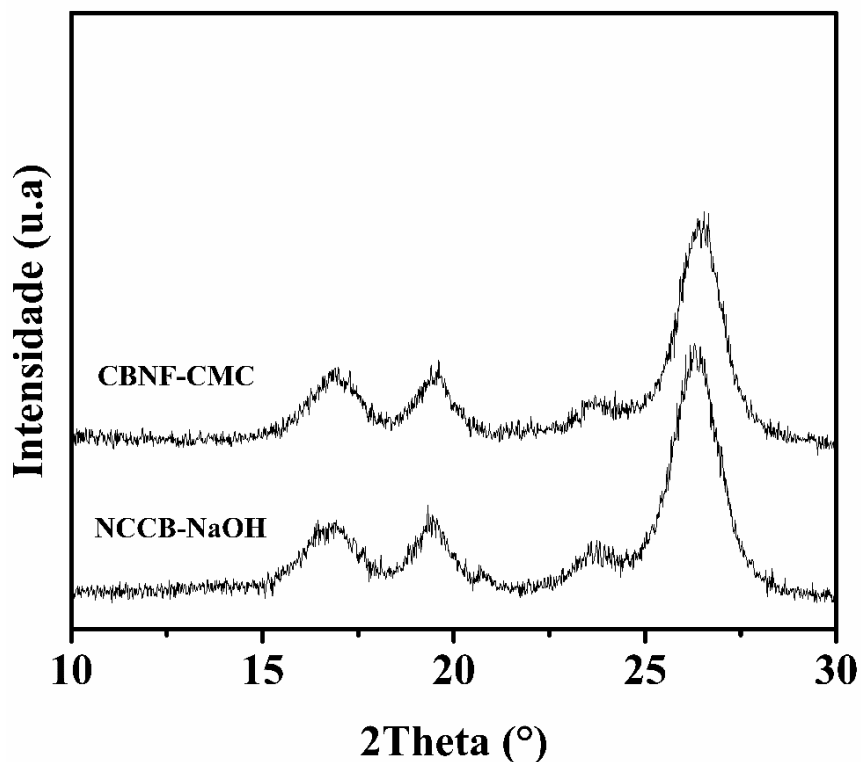
Índices de cristalinidade e tamanhos de cristalito superiores foram encontrados quando um tempo de hidrólise sulfúrica menor foi aplicado para a obtenção de nanocristais de celulose bacteriana. Claro et al. (2024) obteve nanocristais de celulose bacteriana com valor de cristalinidade 90,5%, usando condições semelhantes ao usado na presente investigação (H_2SO_4 64%, 50 C), porém empregando menor tempo de hidrólise (30min) (nesta investigação foi usado H_2SO_4 60%, 45 C, 60min).

Outro estudo também revelou o efeito de diferentes condições de hidrólise (tipo-concentração de ácido e tempo de reação). Na condição de H_2SO_4 60%, 45C, 60min, o índice de cristalinidade alcançado foi de 89% e tamanho de cristalito 5,78nm, valores obtidos por Vasconcelos et al 2017. Enquanto no presente estudo, nas mesmas condições, o índice de cristalinidade alcançado foi de 82% e tamanho de cristalito 8,33nm. A diferença nos resultados observados, com menor índice de cristalinidade (82%) e maior tamanho de cristalito (8,33 nm) no estudo atual, em comparação ao estudo de Vasconcelos et al. (2017), pode ser atribuída à diferença na proporção de celulose e solução ácida. Neste estudo, a proporção utilizada foi 10:200 (ou 5% de sólido), enquanto no estudo de Vasconcelos a proporção foi 1:100 (ou 1% de sólido). Essa maior quantidade de sólido em relação ao ácido pode ter causado uma penetração menos eficiente nas fibras de celulose, resultando em um ataque menos seletivo nas regiões amorfas e cristalinas. Isso pode levar à remoção menos eficiente das regiões amorfas, resultando em menor índice de cristalinidade. No entanto, essa menor eficiência do ataque ácido nas regiões cristalinas pode ter preservado os cristalitos maiores, resultando em um aumento no

tamanho médio dos cristalitos. No estudo de Vasconcelos et al (2017), a maior quantidade de ácido por grama de celulose (1:100) pode ter promovido um ataque mais agressivo e seletivo, resultando em cristalitos menores e um maior índice de cristalinidade.

Os difratogramas de CBNF-CMC e NCCB-NaOH são mostrados na Figura 5.6. Os padrões de difração de raios-X (XRD) mostraram três picos de difração 2θ em torno de 16° , 19° e 26° , geralmente atribuídos aos planos cristalográficos 101 (região amorfa), 10-1 (região amorfa) e 002 (região cristalina) (VASCONCELOS et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2023). A presença desses três picos de difração caracteriza a celulose do tipo I α (triclínica), que é predominante na celulose bacteriana; enquanto a estrutura cristalina do tipo I β (monoclínica) é encontrada na celulose de origem vegetal (VASCONCELOS et al., 2017). Um pico residual em torno de 23° também foi observado, indicando a presença de celulose I (SOMMER; STAROSZCZYK, 2023; SETTER et al., 2023). Como a análise foi realizada em uma estrutura de cobre, todos os picos se deslocam levemente para a direita. Nenhuma transformação da forma cristalina foi observada, pois nenhum novo pico foi detectado nos espectros de difração após o processo de obtenção seguido da secagem por pulverização (spray dryer).

Figura 5.6 – Padrão de difração de raios-X de CBNF-CMC e NCCB-NaOH



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.1.5 Avaliação da secagem e dispersibilidade

Independentemente do método utilizado, as nanoceluloses são produzidas em suspensões aquosas diluídas. Assim, o processo de desidratação e secagem é uma etapa fundamental para comercialização, transporte e atendimento a aplicações específicas (SINQUEFIELD et al., 2020).

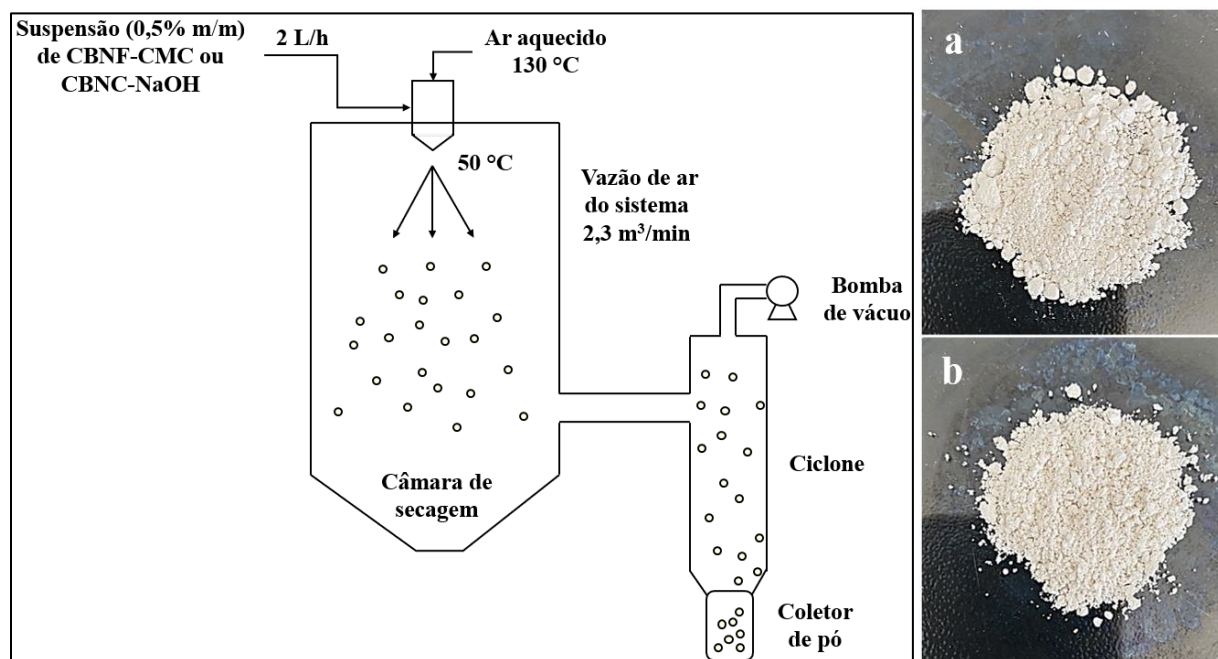
Nanocristais e nanofibrilas enfrentam desafios semelhantes na secagem e redispersão devido à sua alta área superficial, natureza hidrofílica e capacidade de retenção de água, o que resulta em viscosidades tixotrópicas elevadas em suspensões diluídas. Mesmo em baixas concentrações de sólidos (2-3% para nanofibrilas e 8-10% para nanocristais), essas suspensões apresentam comportamento de gel (SINQUEFIELD et al., 2020). A secagem por métodos convencionais pode causar aglomeração irreversível das partículas devido às ligações de hidrogênio, dificultando a redispersão após reidratação. Modificações nas superfícies durante obtenção das nanoceluloses também podem ser comprometidas durante a secagem, tornando necessário a avaliação do efeito da secagem na dispersibilidade e estabilidade do produto durante a reidratação, visando validar a sua aplicação (SETTER et al., 2023).

A secagem por pulverização tem sido o processo de secagem mais utilizado para aplicações em maior escala de nanoceluloses (SINQUEFIELD et al., 2020). O processo de pulverização é rápido, eficiente e de baixo custo, sendo uma tecnologia lucrativa para produzir quantidades de produtos em pó (ESPARZA et al., 2019). Também é versátil e flexível, no qual os parâmetros do processo, como temperatura de entrada, vazão de ar de atomização e pressão e taxa de alimentação, podem ser ajustados para produzir materiais secos com propriedades estáveis específicas (AMIN et al., 2014).

Um fluxograma simplificado do processo de secagem por pulverização de CBNF-CMC e NCCB-NaOH, contendo as condições de secagem utilizadas e o aspecto dos pós obtidos são mostrados na Figura 5.7. A secagem produziu pós de coloração branca. Embora os pós não tenham passado por tamisação (classificação do tamanho de partícula), a observação da formação de ângulos de repouso em ambas as amostras (38°- 45°), indicou propriedade de fluidez razoável a aceitável, inferindo também a obtenção de pós finamente divididos. Uma forma sólida em pó com maior tamanho de partícula possui maior fluidez, sendo a menor, possuinte de muito mais atrito, favorecendo menor fluidez. A fluidez razoável a aceitável indica

ainda que o pó pode apresentar alguma coesão (tendência de se agregarem, formando aglomerados), aspecto também observado em ambas as amostras (Fig 5.7 a e b) (AL-HASHEMI; AL-AMOUDI, 2018; SZALAY, KELEMEN E PINTYE-HÓDI, 2015).

Figura 5.7 – Fluxograma do processo de secagem (lado esquerdo) e produto seco de (a) CBNF-CMC e (b) NCCB-NaOH



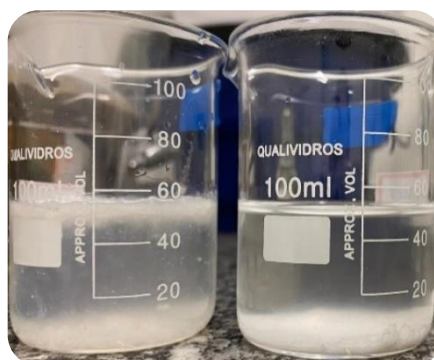
Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, estudos mostraram que a secagem da nanocelulose pode provocar agregação irreversível com perda de suas dimensões originais em nanoescala (DING et al., 2019; KIM et al., 2022). Isto foi explicado pela formação de um grande número de ligações de hidrogênio que podem se formar entre as nanofibrilas ou os nanocristais de celulose após a secagem, em razão da sua alta área de superfície específica (ZAITONE; AL-ZAHRANI, 2021; ESPARZA et al., 2019). Esses tipos de agregação pode dificultar a redispersão após reidratação das nanoceluloses em pó, comprometendo o desempenho do produto final.

A dispersibilidade dos aglomerados nas amostras de CBNF-CMC e NCCB-NaOH foi avaliada por meio da redispersão dos pós em água. Observou-se que o CBNF-CMC apresentou maior solubilidade no início do processo de redispersão (Fig. 5.8), o que pode ser atribuído à funcionalização resultante do contato entre a celulose bacteriana nanofibrilada e a CMC. Investigações anteriores usaram CMC para prevenir a agregação de nanofibrilas de celulose bacteriana durante a autoclavagem, como uma maneira simples e eficaz de manter as

fibras de celulose dispersas na solução durante a esterilização por autoclavagem (ANDRADE et al., 2019). Posteriormente, a CMC foi experimentada para fornecer uma formulação de CB em pó totalmente redispersível, com capacidade de formar emulsões estáveis. Esse estudo usou uma formulação com proporção CB:CMC de 1:1 e secagens em chapa quente ou forno (MARTINS et al., 2020b, liofilização (MARTINS et al., 2021) e spray drier (MARTINS et al., 2020a). Para todos os casos a CMC foi adicionada após a etapa de desintegração da celulose.

Figura 5.8 – Solubilidade em contato com a água no início da redispersão. CBNF-CMC (lado esquerdo) e NCCB-NaOH (lado direito).



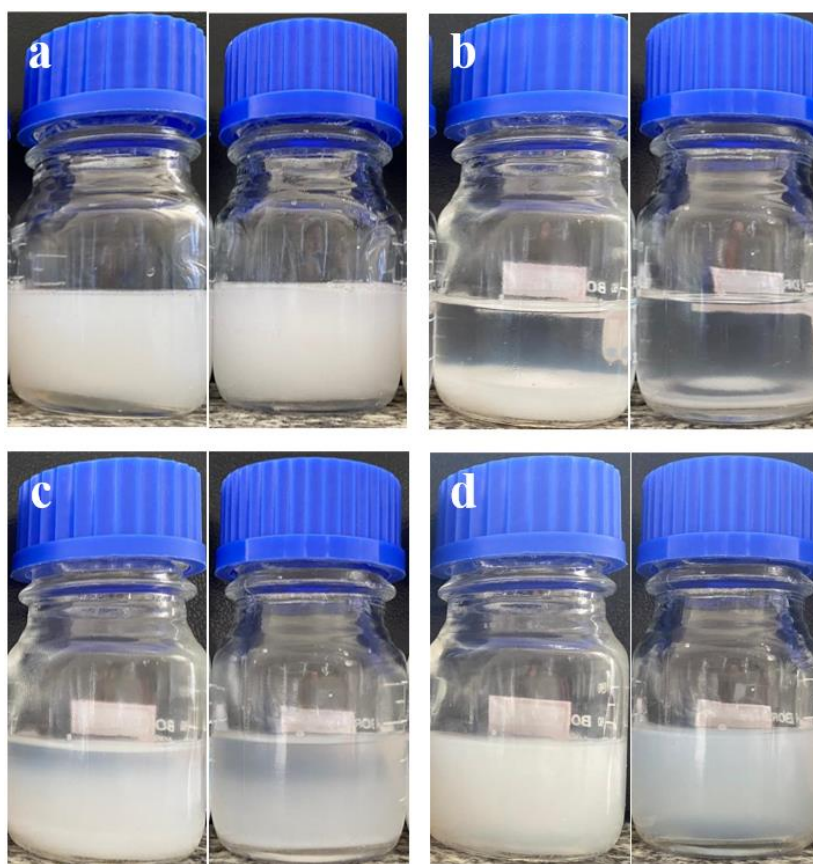
Fonte: Elaborado pelo autor.

As avaliações de dispersibilidade e estabilidade estão apresentadas na Figura 5.9. Para as amostras de CBNF-CMC ou NCCB-NaOH secas e redispersas por agitação manual ou sob baixo cisalhamento (agitação magnética à 45°C), observou-se sedimentação após 48h, indicando que esses métodos não foram suficientes quebrar completamente os agregados mais densos. Em contraste, as amostras redispersas por ultrassom foram completamente dispersas e permaneceram estáveis após 48h, com estabilidade prolongada por até 12 meses (4°C). Esparza et al. (2019) sugeriram que a maior coesão entre nanocristais agregados durante a secagem e a menor porosidade das partículas resultaram em maior resistência, exigindo mais energia para desagregar os aglomerados. Estudos também indicaram que os agregados formados na secagem por pulverização foram eficientemente redispersos por ultrassonicação (BEUGUEL et al., 2018, ESPARZA et al., 2019).

A redispersão das partículas agregadas pode ser facilitada pela adição de surfactantes antes da secagem por pulverização. Isso foi atribuído à presença de partículas porosas e à redução nas interações entre as partículas, promovida pelas moléculas de surfactante

adsorvidas (ESPARZA et al., 2019). Esse comportamento também foi observado em estudos que utilizaram CMC antes da secagem (MARTINS et al., 2020b; MARTINS et al., 2021; MARTINS et al., 2020a). A CMC apresenta ainda a vantagem de ser um polímero de base natural derivado da celulose, sendo amplamente utilizado na indústria devido ao seu baixo custo.

Figura 5.9 – Dispersibilidade de CBNF-CMC e NCCB-NaOH (lado esquerdo e lado direito de cada letra, respectivamente): (a) suspensão antes da secagem, (b) dispersão por agitação manual, (c) agitação magnética à 45°C e (d) ultrassom (b-d dispersibilidade após 48h)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, as cargas de CBNF-CMC ou NCCB-NaOH após redispersão por ultrassom, exibiram valores de $-91,3 \pm 3,8$ e $-40,7 \pm 0,89$ mV, demonstrando alta estabilidade (MALVERN, 2014). As dispersões obtidas pelo método de ultrassom se mostraram ainda mais claras, comparadas às suspensões antes da secagem. Isso sugere que o ultrassom desagregou ainda mais as nanoceluloses, produzindo misturas mais homogêneas e finamente dispersas.

Portanto, na presente investigação, a combinação do uso da CMC ainda no processo de nanofibrilação da celulose, uma proporção de CMC significativamente menor (proporção

CB:CMC de 4:1) a que foi relatada por Martins et al (2020^a; 2020b; 2021) (proporção CB:CMC de 1:1) e a nanofibrilação por microfluidização são os destaques de maior relevância. Quanto a NCCB-NaOH, nenhum surfactante foi necessário para secagem, como geralmente tem sido relatado. Isso também não influenciou na redispersão e estabilidade da suspensão, sugerindo que o processo de neutralização por NaOH pode ser mantido para obter um produto seco em pó, utilizando a pulverização.

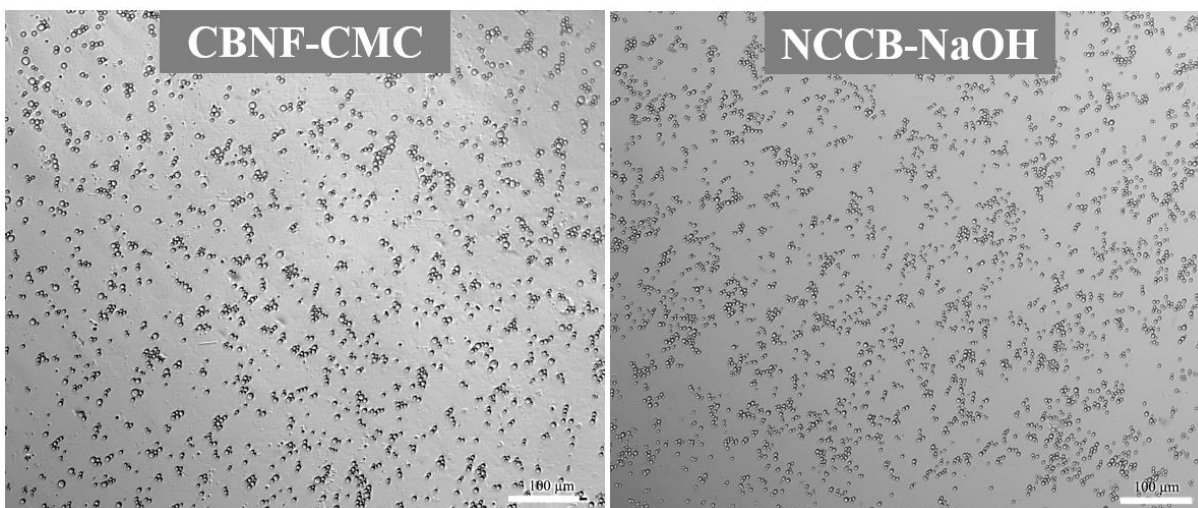
Essas abordagens se mostram promissoras para a produção de nanocelulose seca redispersíveis, o que permite expandir a comercialização e a sua aplicação de em vários setores (SETTER et al., 2023).

5.3.2 Formação e estabilidade das emulsões Pickering

A avaliação das propriedades funcionais das nanoceluloses CBNF-CMC e NCCB-NaOH foi realizada com foco na capacidade de formação e estabilidade de emulsões Pickering do tipo óleo-em-água. O CBNF-CMC ou o NCCB-NaOH em suspensões foram usados em um teste de estabilidade usando um sistema de óleo de girassol (10 %), água (90 %) e NaCl (50mM), semelhante à uma aplicação alimentícia, com combinação próxima às condições máximas exigidas para alimentos com baixo teor de sódio (UE: NaCl, 51mM) .

Emulsões preparadas com 1% (m/m) dos hidrocolóides foram totalmente estáveis, sem evidências de óleo na superfície das emulsões. As análises microscópicas confirmaram a formação completa de gotas de óleo, que mantiveram sua integridade estrutural ao longo de um período de armazenamento de 30 dias. A Figura 5.10 mostra as imagens de microscopia óptica das emulsões formadas. Os processos de emulsificação de microfluidização e ultrassom produziram emulsões homogêneas estabilizadas por CBNF-CMC ou NCCB-NaOH, respectivamente, demonstrando a formação de pequenas gotas de óleo, embora, maiores que as encontradas em sistemas utilizando emulsificantes sintéticos, como Tween 80 (SAMPAIO et al., 2022) ou outros emulsificantes de base naturais como os rhamnolipídeos (AZEVEDA et al., 2023). O tamanho das gotas finais de emulsões Pickering geralmente são maiores, porém isso não compromete necessariamente a sua estabilidade. Partículas sólidas criam uma barreira física ao redor das gotículas da emulsão que impede sua coalescência, melhorando assim a estabilidade e tornando o tamanho um fator menos decisivo (BINKS, 2002; SHABIR et al., 2023).

Figura 5.10 – Imagens de microscopia óptica das emulsões formadas por CBNF-CMC ou NCCB-NaOH. A barra de escala é 100 μm .



Fonte: Elaborada pelo autor.

O diâmetro médio das gotas estabilizadas por CBNF-CMC foi de $3,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$, foi cerca de 50% maior quando comparado as gotas formadas por NCCB-NaOH ($1,61 \pm 0,2 \mu\text{m}$). As nanofibrilas são mais longas e flexíveis, portanto, tendem a formar gotas maiores. Além disso, CBNF-CMC tem uma alta razão de aspecto, tendendo a adsorver mais lentamente na interface, aumentando o tamanho final das gotículas (ALBERT et al., 2019; TEO et al., 2022). Nanocristais possuem forma de bastão curto, projetando emulsões com menores diâmetros de gotas, quando usados para estabilizar sistemas com iguais concentrações de celulose e óleo (MIKULCOVÁ et al., 2023). Após 30 dias de armazenamento as emulsões estabilizadas por CBNF-CMC e NCCB-NaOH foram de $2,7 \pm 0,04 \mu\text{m}$ e $2,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, respectivamente. As emulsões preservaram a estabilidade das gotas ao longo do tempo, não evidenciando sinais de instabilidade de separação de fases ou coalescência. Os sistemas de emulsões também não apresentaram formação de *creaming*, comum em emulsões Pickering. Emulsões Pickering tendem a formar gotas com maiores diâmetros e volume de óleo. Isso tornam as gotas mais leves devido a menor densidade tendendo a formar uma camada de *creaming*, porém as gotas ainda podem permanecer estáveis por longo período de armazenamento (BAI et al., 2019).

As gotas formadas pelas emulsões estabilizadas por CBNF-CMC e NCCB-NaOH apresentaram diâmetros inferiores ao obtidos por seus pares seguindo as rotas convencionais, relatadas no capítulo anterior. O potencial zeta de emulsões contendo CBNF-CMC foi $-48,6 \pm 0,5 \text{ mV}$, um valor semelhante foi encontrado para emulsões NCCB-NaOH $-49,1 \pm 0,4 \text{ mV}$.

Portanto, todas as emulsões formuladas com CBNF-CMC ou NCCB-NaOH apresentaram potencial zeta acima de $|30 \text{ mV}|$, que corresponde à sistemas altamente estáveis.

Sistemas de CB:CMC (1:1; 1:0,75; 1:0,5) também foram avaliados por Martins et al (2023) como estabilizante em emulsões de óleo em água de grau alimentício em um estudo comparativo com gama xantana. Emulsões de óleo de girassol em água de grau alimentício (20% de óleo) foram preparadas com 0,3% dos hidrocolóides de teste, com 150 mM de NaCl e pH 3,5. Emulsões com BC:CMC nas proporções de 1:0,75 e 1:0,5 apresentaram gotículas menores, comportamento sólido mais forte e resistiram à centrifugação com pouca separação de fases. Na investigação atual o sistema CB:CMC proposto utilizou celulose bacteriana nanofibrilada e por isso se beneficiou de um sistema com tamanho de gotas mais finos, alcançando diâmetros médio quase 100 vezes menor ao obtido por Martins et al (2023). Apesar da diferença no teor de óleo usado, a formação de gotas maiores se deveu principalmente pelas dimensões elevadas de diâmetro e comprimento da celulose bacteriana, obtidos pelo tipo e condições de processos estabelecidos. Em emulsões, um tamanho menor de gotícula leva a mais área de superfície de contato entre as gotículas e permite um empacotamento mais eficiente da fase dispersa (LIU et al., 2007; CHUNG; MCCLEMENTS, 2015). De acordo com Golchoobi et al. (2016), o aumento do tamanho da fase dispersa pode afetar negativamente a firmeza e a coesão na textura de um alimento. Portanto, a forma nanofibrilada de celulose bacteriana em um sistema NFCB-CMC demonstrou propriedades aprimoradas de aplicação em emulsões Pickering em alimentos. Gotas maiores também podem favorecer a formação de *creaming* que, ao longo do tempo de armazenamento, ou em um estudo de estabilidade acelerada por força centrífuga, podem quebrar, fenômeno observado por Martins et al (2023).

Esses resultados confirmam o alto desempenho das formulações de sistemas CB:CMC na estabilização de sistemas coloidais e que a microfluidização demonstra ser uma proposta para viabilizar a sua produção pode acelerar a ampliação da sua aplicação.

5.3.3 Citotoxicidade

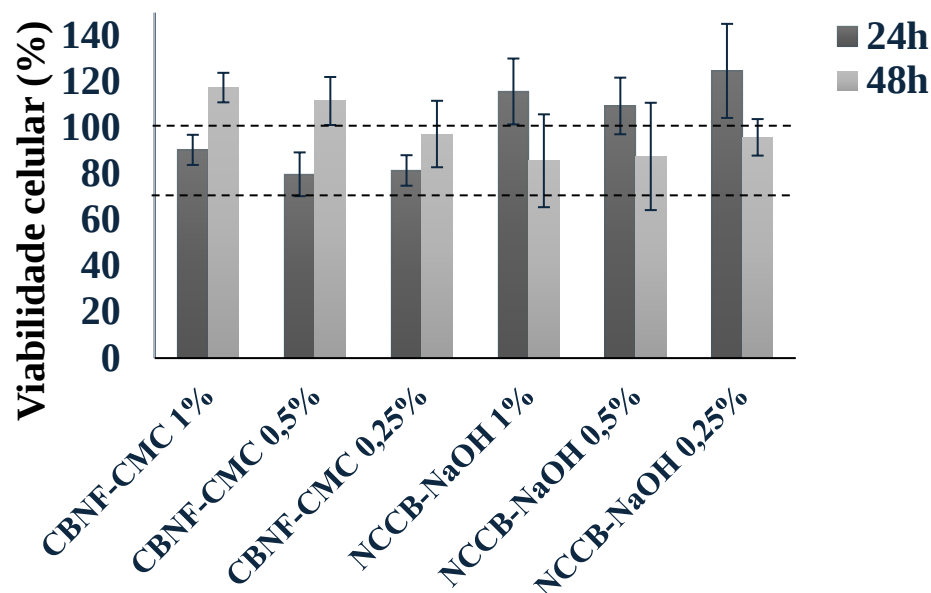
Apesar das vantagens, e devido ao seu tamanho em nanoescala, tanto CBNF-CMC quanto NCCB-NaOH devem ser avaliados de uma perspectiva de segurança que considere sua exposição, destino e efeitos biológicos para ajudar a estimar com mais precisão seus riscos potenciais (CAÑAS-GUTIÉRREZ et al., 2024). A citotoxicidade das nanoceluloses foi avaliada de acordo com a norma internacional ISO 10993-12 pelo método indireto da resazurina,

utilizando células fibroblastos murinos (L929). A citotoxicidade se refere aos efeitos adversos de uma substância na viabilidade celular (ROMAN, 2014).

O método de resazurina facilita a compreensão do potencial efeito citotóxico das nanoceluloses, fornecendo dados quantitativos sobre a viabilidade celular (PETITI; REVEL; DIVIETO, 2024). As células fibroblastos murinos (L929) são uma linha celular padrão para estudos iniciais de citotoxicidade, fornecendo uma primeira visão sobre a biocompatibilidade de nanomateriais em mamíferos. São altamente sensíveis a mudanças no ambiente celular, o que permite detectar efeitos tóxicos sutis causados por nanomateriais, o que torna esses fibroblastos ideais para ensaios de citotoxicidade com materiais como a nanocelulose, que pode interagir com células de forma diferente dependendo da sua composição e estrutura (SRIKANTH et al., 2020).

A Figura 5.11 mostra os percentuais de células viáveis para CBNF-CMC e NCCB-NaOH secos em pó. Para CBNF-CMC, os resultados indicam uma leve citotoxicidade inicial nas primeiras 24 h, com a viabilidade celular diminuindo em alguns casos para aproximadamente 81%. No entanto, a maioria dos valores se mantém acima de 80%, o que sugere uma biocompatibilidade razoável no curto prazo. Após 48 h, os percentuais de viabilidade celular se mostram mais favoráveis, inclusive com alguns valores acima de 100%, sugerindo potencial proliferação celular (115,32% e 102,82%). Isso pode indicar que a presença de nanofibrilas de celulose, combinadas com carboximetilcelulose (CMC), não apenas não foi tóxica após um período mais longo, como também pode ter estimulado a proliferação celular, um efeito observado em algumas investigações sobre materiais poliméricos biocompatíveis.

Figura 5.11 – Viabilidade de células fibroblastos murinos (L929) após incubação por 24 h ou 48 h a 37 °C de CBNF-CMC e NCCB-NaOH em diferentes concentrações (1%, 0,5%, 0,25%)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudos semelhantes com nanofibrilas de celulose e seus derivados, têm mostrado que a citotoxicidade geralmente depende da dose, tamanho e funcionalização superficial (LIN; DUFRESNE, 2014; AIMONEN et al., 2022). A presença da CMC pode estar contribuindo para uma maior biocompatibilidade ao conferir hidrofobicidade controlada e reduzir a interação negativa com as membranas celulares. A literatura sobre nanofibrila de celulose sugere que quando funcionalizadas com grupos carboxílicos ou outros polímeros biocompatíveis, as nanofibrilas tendem a ser seguras e têm um bom perfil de citotoxicidade (TAMO et al; 2024; ZHANG; ZHANG; WNAG et al., 2021).

Os dados indicam que nas primeiras 24 h, a viabilidade celular foi muito alta, com valores variando entre 110,64% e 144,65%. Isso sugere que os nanocristais de celulose neutralizados por NaOH podem ter efeitos benéficos nas células em curtos períodos de exposição, promovendo a viabilidade e possivelmente estimulando a atividade celular. No entanto, após 48 h, observou-se uma redução na viabilidade celular, com alguns valores caindo para aproximadamente 74% a 77%, embora ainda dentro de um intervalo de segurança moderado, já que permanece acima de 70%.

Esse comportamento pode estar relacionado com a natureza mais rígida e cristalina dos nanocristais em comparação com os nanocristais. Os nanocristais tendem a ter interações mais específicas com as células devido à sua menor área de superfície e estrutura mais definida.

A neutralização por NaOH pode ter modificado ligeiramente a superfície dos nanocristais, tornando-os menos agressivos no curto prazo, mas a redução na viabilidade após 48 h pode indicar algum acúmulo de stress celular ao longo do tempo. Comparando com investigações científicas, muitos estudos apontam que nanocristais têm uma citotoxicidade dependente da concentração e da exposição prolongada, e os resultados obtidos aqui seguem essa tendência (ROMAN, 2014); VENTURA et al., 2022).

Considerando os dados de viabilidade celular, ambas as nanoceluloses parecem ser seguras para uso como estabilizadores de emulsões Pickering em concentrações adequadas. Os valores de viabilidade celular estão consistentemente acima de 70%, o que é considerado um limite aceitável de citotoxicidade em muitos estudos de segurança de materiais. No entanto, NCCB-NaOH exige atenção, pois os níveis de viabilidade celular diminuem após 48 h, sugerindo uma possível toxicidade a longo prazo em concentrações mais altas. Considerando o contexto alimentar, concentrações abaixo de 1% podem ser consideradas mais seguras, desde que validadas por estudos adicionais. Por outro lado, CBNF-CMC mostrou um perfil mais seguro a longo prazo, dado seu perfil de viabilidade celular consistente e baixa toxicidade mesmo após 48 h.

5.4 Conclusão

Processos de obtenção de celulose nanofibrilada e nanocristais de celulose foram avaliados para minimizar o alto consumo de energia e impactos ambientais dos métodos convencionais de produção. As características das nanocelulose foram avaliadas, visando otimizar a aplicação dessas nanoceluloses em sistemas de emulsões Pickering. Celulose nanofibrilada (CBNF-CMC) foi produzida por processamento em microfluidizador usando CMC como um agente de dispersão e nanocristais de celulose (NCCB-NaOH) foram produzidos por hidrólise sulfúrica e neutralizadas por NaOH. As propriedades funcionais das nanoceluloses foram investigadas na capacidade de formação e estabilidade de emulsões Pickering óleo em água de grau alimentício. Como resultados dos novos processos propostos foi descoberto que a neutralização balanceada de nanocristais de celulose por NaOH substituiu efetivamente o uso de diálise por membrana, não alterando suas propriedades tecnológicas, mantendo-os adequados para a estabilização de emulsões. O processamento de CMC (carboximetilcelulose) juntamente com a celulose nanofibrilada propiciou um tipo de

funcionalização por contato que pode substituir o uso de funcionalização química pelo catalizador TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil), que demanda menor tempo de processo. A secagem por spray dryer originou nanocristais e nanofibrilas de celulose bacteriana completamente redispersíveis, não alterando suas propriedades tecnológicas. As novas abordagens de processamento permitiram a produção de suspensões de nanoceluloses bacteriana estáveis através de processos escalonáveis e aptas para a aplicação em sistemas de emulsões Pickering na indústria de alimentos. No entanto, análises de segurança complementares sobre a segurança do uso dessas nanoceluloses devem ser realizadas para garantir sua aplicação e comercialização na indústria de alimentos, especialmente para NaOH.

5.5 Referências

- AZEREDO, H. M. C. *et al.* Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>. Acesso em: 23 jan. 2024.
- CARLSSON, D. O. *et al.* Cooxidant-free TEMPO-mediated oxidation of highly crystalline nanocellulose in water. **RSC Advances**, v. 4, issue 94, p. 52289-52298, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c4ra11182f>. Acesso em: 23 jan. 2024.
- CHEN, S. *et al.* Integrating direct reuse and extraction recovery of TEMPO for production of cellulose nanofibrils. **Carbohydrate Polymers**, v. 294, pp. 119803, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119803>. Acesso em: 13 mai. 2024.
- FERNANDES, A. *et al.* Nanotechnology Applied to Cellulosic Materials. **Materials**, v. 16, issue 8, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma16083104>. Acesso em: 30 nov. 2024.
- FRENCH, A.D., SANTIAGO CINTRÓN, M. Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index. **Cellulose**, v. 20, pp. 583–588, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9833-y>. Acesso em: 30 nov. 2023.
- HUANG, Y. *et al.* Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, pp. 1-30, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z>. Acesso em: 30 nov. 2023.
- JIA, Y. *et al.* Surfactant-free emulsions stabilized by tempo-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 907-915, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.099>. Acesso em: 30 nov. 2023.
- KALIA, S. *et al.* Nanofibrillated cellulose: surface modification and potential applications. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, p. 5-31, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00396-013-3112-9>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KARGARZADEH, H. *et al.* Methods for Extraction of Nanocellulose from Various Sources. In: KARGARZADEH, H. *et al.* (ed.). **Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites**. Weinheim: Wiley-VCH, p. 1-49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527689972.ch1>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, Q. *et al.* Flexible cellulose nanofibrils as novel Pickering stabilizers: The emulsifying property and packing behavior. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 180-189, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.039>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LI, X. *et al.* Cellulose nanocrystals (CNCs) with different crystalline allomorph for oil in water Pickering emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, pp 303-310, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.085>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARTINS, D. *et al.*, A dry and fully dispersible bacterial cellulose formulation as a stabilizer for oil-in-water emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, p. 115657, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115657>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MARTINS, D. *et al.*, Dry Bacterial Cellulose and Carboxymethyl Cellulose formulations with interfacial-active performance: processing conditions and redispersion. **Cellulose**, v. 27, p. 6505-6520, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03211-9>. Acesso em: 30 nov. 2023.

MAZEGA, A. *et al.* Kinetic study and real-time monitoring strategy for TEMPO-mediated oxidation of bleached eucalyptus fibers. **Cellulose**, v. 30, pp. 1421 – 1436, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-022-05013-7>. Acesso em: 13 mai. 2024.

MILANOVIC, J. *et al.* Stability of TEMPO-oxidized cotton fibers during natural aging. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, pp. 115587, 2020.

MISSOUM, K; BELGACEM M. N.; BRAS, J. Nanofibrillated Cellulose Surface Modification: A Review. **Materials**, v. 6, pp. 1745-1766, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma6051745>. Acesso em: 30 nov. 2023.

NOREMYLIA, M. B.; HASSAN, M. Z.; ISMAIL, Z. Recent advancement in isolation, processing, characterization and applications of emerging nanocellulose: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 206, p. 954-976, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.064>. Acesso em: 03 out. 2023.

PATIL, T. V. *et al.* Nanocellulose, a versatile platform: From the delivery of active molecules to tissue engineering applications. **Bioact. Mater.**, v. 9, p. 566-589, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.07.006>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PENG, Y.; GARDNER, D. J.; HAN, Y. *et al.* Drying cellulose nanofibrils: in search of a suitable method. **Cellulose**, v. 19, pp. 91–102, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9630-z>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PHANTHONG, P. *et al.* Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, issue 1, p. 32-43, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.004>. Acesso em: 30 nov. 2023.

PRADHAN, D.; JAISWAL, A. K.; JISWAL, S. Emerging technologies for the production of nanocellulose from lignocellulosic biomass. **Carbohydrate Polymers**, v. 285, pp. 119258, 2022.

SAITO, T. *et al.* Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 8, issue 8, p. 2485–2491, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm0703970>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SANCHEZ-SALVADOR, J. L. *et al.* Enhancement of the production of TEMPO-mediated oxidation cellulose nanofibrils by kneading. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 261, pp. 129612, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129612>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SANCHEZ-SALVADOR, J. L. *et al.* Increasing the Possibilities of TEMPO-Mediated Oxidation in the Production of Cellulose Nanofibers by Reducing the Reaction Time and Reusing the Reaction Medium. *Advanced Sustainable Systems*, v. 5, pp. 2000277, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adsu.202000277>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SEGAL, L. *et al.* An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, pp. 786-794, 1959. Disponível em: [10.1177/004051755902901003](https://doi.org/10.1177/004051755902901003). Acesso em: 30 nov. 2023.

SERRA, A. *et al.* Reducing the Amount of Catalyst in TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers: Effect on Properties and Cost. **Polymers**, v. 11, pp. 557. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym9110557>. Acesso em: 30 nov. 2023.

SINGHSA, P.; NARAIN, R.; MANUSPIYA, H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. *Cellulose*, v. 25, pp. 1571–1581, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1699-1>. Acesso em: 30 nov. 2023.

XU, H. *et al.* Optimization of reagent consumption in TEMPO-mediated oxidation of *Eucalyptus* cellulose to obtain cellulose nanofibers. **Cellulose**, v. 29, pp. 6611–6627, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04672-w>. Acesso em: 30 nov. 2023.

XU, H. *et al.* Recycling of TEMPO-mediated oxidation medium and its effect on nanocellulose Properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 319, pp. 121168, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121168>. Acesso em: 30 nov. 2023.

ZHAI, X. *et al.* Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. **Food Research International**, v. 103, p. 12-20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.030>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ZHANG, H. *et al.* Extraction and comparison of cellulose nanocrystals from lemon (*Citrus limon*) seeds using sulfuric acid hydrolysis and oxidation methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 238, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116180>. Acesso em: 22 jan.

2023.

ZHANG, L. *et al.* Greener production of cellulose nanocrystals: An optimised design and life cycle assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 345, pp. 131073, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131073>. Acesso em: 30 nov. 2023.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

O trabalho realizado para esta tese de doutorado levou à avaliação de nanoceluloses bacteriana obtidas por diferentes processos de obtenção em sistemas de emulsões Pickering óleo em água projetados para a formulação de produtos alimentícios. O primeiro estudo foi dedicado a preencher lacunas em investigações sobre o uso de nanoceluloses em emulsões diluídas (1 % de óleo). As nanoceluloses obtidas por processos convencionais (nanofibrilas oxidadas por TEMPO e nanocristais obtidas por hidrólise sulfúrica) foram avaliadas para este estudo.

No segundo estudo processos de obtenção de celulose nanofibrilada e nanocristais de celulose foram avaliados para minimizar o alto consumo de energia e impactos ambientais dos métodos convencionais de produção. Foi avaliado o uso de carboximetilcelulose (CMC) para facilitar o processo de obtenção de celulose nanofibrilada e a neutralização por NaOH para a produção de nanocristais de celulose, visando minimizar os impactos ambientais e otimizar a aplicação dessas nanoceluloses em emulsões Pickering. Além disso, os desempenhos desses materiais secos por pulverização também foram avaliados quanto à dispersibilidade e suas propriedades funcionais na capacidade de formação e estabilidade de emulsões Pickering óleo em água de grau alimentício.

No primeiro estudo observou-se o efeito das concentrações de nanocelulose e sal na tensão interfacial, tamanho, estabilidade e reologia. Ao aumentar a concentração de nanocelulose, a tensão interfacial é reduzida. Maior estabilidade foi observada para concentrações elevadas de sal e nanocelulose. Para emulsões estabilizadas por NCCB, uma menor concentração de celulose combinada com baixas concentrações de sal mostrou ser suficiente para a estabilização total das gotículas. Do ponto de vista reológico, a adição de NaCl causa um aumento na viscosidade, que foi mais pronunciado nas amostras de CBNF. Esses resultados indicaram que o uso de CBNF ou NCCB, juntamente com sal, permite ajustar as propriedades da emulsão para aplicações específicas, como o aprisionamento de gotículas de óleo em sistemas distintos projetados para a formulação de produtos alimentícios com baixo teor de gordura.

No segundo estudo, a neutralização balanceada de nanocristais de celulose por NaOH substituiu efetivamente o uso de diálise por membrana, não alterando suas propriedades tecnológicas, mantendo-os adequados para a estabilização de emulsões. O mesmo ocorreu para a celulose nanofibrilada em sistema CBNF-CMC. O processamento de CMC (carboximetilcelulose) juntamente com a celulose nanofibrilada por microfluidização propiciou um tipo de funcionalização por contato que pode substituir o uso de funcionalização química pelo catalizador TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil), que demanda menor tempo de processo. A secagem por spray dryer originou nanocristais e nanofibrilas de celulose bacteriana completamente redispersíveis, não alterando suas propriedades tecnológicas. As novas abordagens de processamento permitiram a produção de suspensões de nanoceluloses bacteriana estáveis através de processos escalonáveis e aptas para a aplicação em sistemas de emulsões Pickering, mas requer ainda pesquisas detalhadas e complementares para garantir a segurança em aplicações alimentares.

6.2 Perspectivas

O trabalho com as nanocelulose obtidas por processos convencionais foram extensivamente estudados em sistemas de emulsões óleo em água. No entanto, dada a complexidade dos sistemas de emulsão e dos produtos alimentares, a realização de estudos específicos para abordar diferentes propriedades físico-químicas e sensoriais podem ainda ser realizados. No entanto, a busca por processos mais limpos e de baixo impacto ambiental trazem alta perspectivas para uso das nanocelulose obtidas por meio dos processos aprimorados neste trabalho. A abordagem do uso de nanocelulose obtidas pelos novos processos em alimentos bem como a caracterização dessas nanoestruturas ainda é ampla para ser explorada. Alguns estudos podem ser destacados:

- Caracterização das suspensões seca e nunca seca quanto à propriedades reológicas, estabilidade térmica, estabilidade coloidal por mudança de pH ou força iônica; morfologia da nanocelulose seca em pó e a influência no mecanismo de estabilização;
- Caracterização das suspensões seca e nunca seca quanto à propriedades reológicas, estabilidade térmica, estabilidade coloidal por mudança de pH ou força iônica; morfologia da nanocelulose seca em pó e a influência da nanoceluloses redispersa no mecanismo de estabilização de emulsões;

- Aplicações em sistemas de emulsões com baixo teor de óleo ou sistemas de emulsões HIPE para caracterização e estudo de estabilidade;
- Avaliação da proteção e entrega de compostos bioativos, avaliação da estabilidade, bioacessibilidade e biodisponibilidade por estudos *in vitro* e *in vivo*.
- Aplicação em diferentes matrizes alimentares como bebidas ou biscoitos, que permitem para avaliar estabilidade em diferentes condições de processos como temperaturas de esterilização e forneamento, por exemplo;
- Aplicações em impressão 3D de alimentos baseada em extrusão de tinta comestível para pacientes com disfagia.

O aprimoramento de processos e aplicação da celulose bacteriana na área de alimentos para emulsões Pickering pode ainda ser ampliado para sistemas de aplicações cosmética e de fármacos, aumentando sua aplicação e, conseqüentemente, a perspectiva de produção em escala. Esses estudos reforçam o potencial demonstrado ao longo desta tese para o uso da celulose bacteriana como um emulsificante de base natural, superando outros emulsificantes naturais ou de bases naturais.