

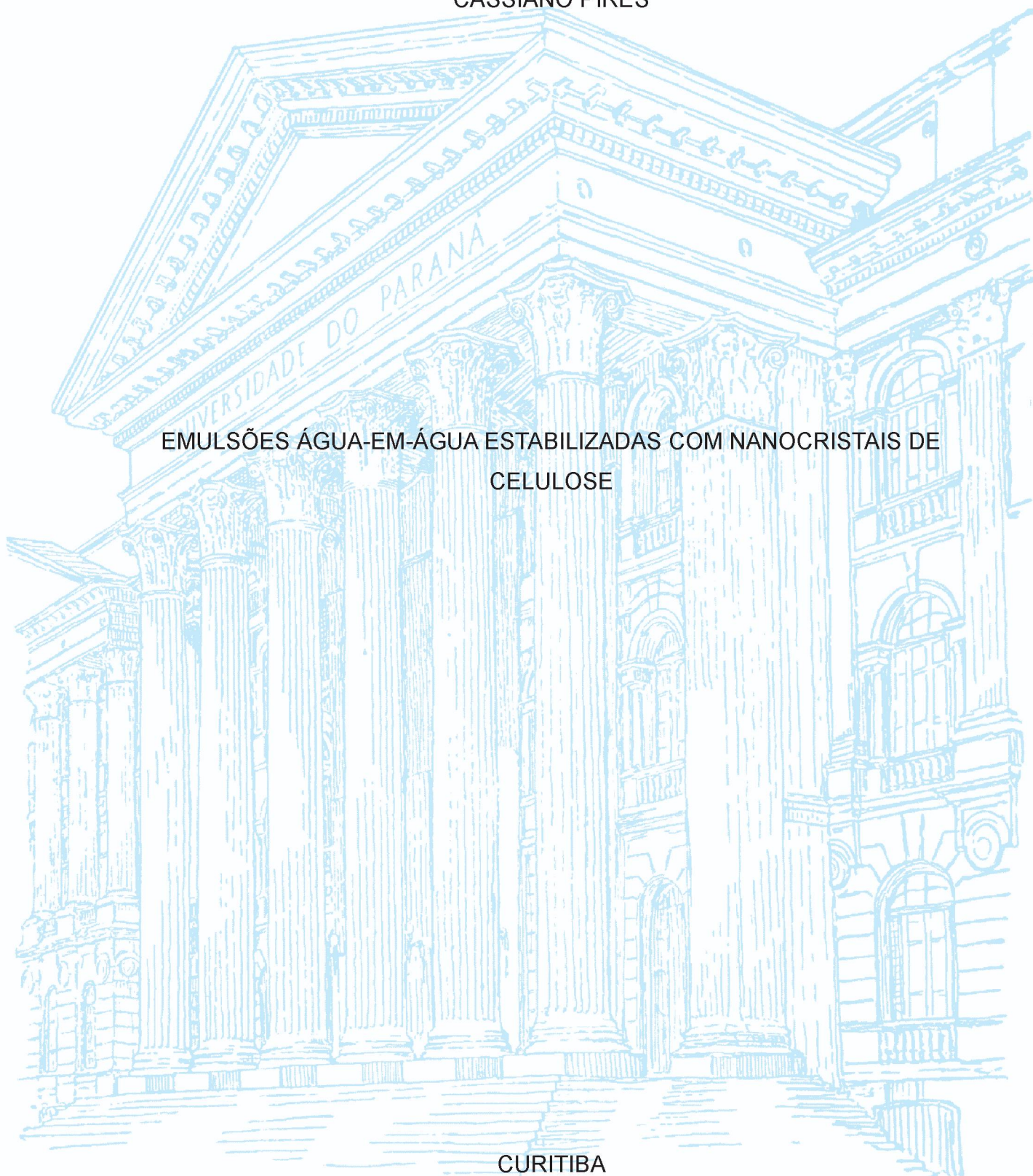
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CASSIANO PIRES

EMULSÕES ÁGUA-EM-ÁGUA ESTABILIZADAS COM NANOCRISTAIS DE
CELULOSE

CURITIBA

2020



CASSIANO PIRES

EMULSÕES ÁGUA-EM-ÁGUA ESTABILIZADAS COM NANOCRISTAIS DE
CELULOSE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

P667e Pires, Cassiano
Emulsões água-em-água estabilizadas com nanocristais de celulose [recurso eletrônico] / Cassiano Pires. – Curitiba, 2020.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

Orientador: Rilton Alves de Freitas.

1. Emulsões. 2. Macromoléculas. 3. Polissacarídeos. 4. Biopolímeros. I. Universidade Federal do Paraná. II. Freitas, Rilton Alves de. III. Título.

CDD: 660.294514

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Exatas
Departamento de Química
Coordenação de Pós-Graduação

Declaração

Declaramos, para os devidos fins, que **Cassiano Pires** fez Defesa Pública de sua Dissertação de Mestrado intitulada “**Emulsões água em água estabilizadas com nanocristais de celulose**”, em 21 de fevereiro de 2020. O trabalho foi avaliado por uma banca examinadora composta pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas (DQ/UFPR)
Prof.^a Dr.^a Maria Alice Witt (ECV/PUC-PR)
Prof. Dr. Eduardo Lemos de Sá (DQ/UFPR)

Após a avaliação, o aluno foi considerado **aprovado**.

Informamos ainda que o referido aluno obteve aprovação em todas as disciplinas cursadas no Mestrado e está, no momento, aguardando os trâmites legais para a obtenção de seu diploma de Mestre em Química.

Por ser verdade, firmamos a presente declaração,

Curitiba, 21 de fevereiro de 2020.



Izabel Vidotti
Izabel Cristina Riegel Vidotti
Coordenadora

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Margarida Parize Pires e José Carlos Pires e minha irmã, Carmen Lucia Pires, por todo apoio e incentivo desde a graduação.

À Samya H. Mehanna, por todo companheirismo, compreensão e apoio.

Ao professor Dr. Rilton A. de Freitas, a quem tenho imensa admiração e por sempre se mostrar presente em todas as etapas do projeto.

A todos os professores do Departamento de Química da UFPR.

A todos os colegas do BioPol, especialmente Bianca e Jacke que me ajudaram de maneira essencial nesse projeto.

*“Ninguém pode entrar duas vezes no mesmo rio,
pois quando nele se entra novamente, não se encontra as mesmas águas, e o
próprio ser já se modificou. Assim, tudo é regido pela dialética, a tensão e o
revezamento dos opostos. Portanto, o real é sempre fruto da mudança, ou seja, do
combate entre os contrários.”*

Heráclito de Efeso

RESUMO

Emulsões são sistemas termodinamicamente metaestáveis e amplamente estudados na literatura, destaca-se o estudo de sua estabilidade, que é muito importante e estratégico do ponto de vista tecnológico e industrial, como na indústria de alimentos, por exemplo. Outro tipo de emulsão, conhecida como “emulsões água-em-água” vem ganhando notoriedade na literatura. As mesmas podem ser obtidas a partir da mistura de macromoléculas, como polissacarídeos hidrofílicos, que são dispersíveis em água mas incompatíveis, termodinamicamente, entre si. No caso desse tipo de emulsões, a estabilização por moléculas de surfactantes tradicionais não pode ser realizada, uma vez que ambos os polissacarídeos são hidrofílicos. Uma alternativa para estabilização são as partículas, que podem interagir parcialmente com ambas as fases, migrando para a interface desse sistema, estabilizando-lhe, quer seja por impedimento estérico ou outros mecanismos. No presente trabalho será estudado um sistema de emulsão água-em-água, formado por dois polissacarídeos: amilopectina (AMP) e xiloglucana (XG). As partículas estudadas para a estabilização desse sistema são os nanocristais de celulose (NCC), que apresentam uma interação preferencial com a XG, modulada pelo teor de sulfato presente na superfície desses cristais. Foram utilizados cinco tipos de nanocristais de celulose, sendo quatro com distintos teores de sulfato (240; 94; 58 e 23 mmol kg⁻¹) e um fosfatado (56 mmol kg⁻¹). Diferem-se, também, pela morfologia, os nanocristais sulfatados se apresentam em forma de bastão, com 150 nm x 5 nm e agregados em formato de toroides com cerca de 4 µm, já os fosfatados se apresentam em formatos esféricos com cerca de 4 µm e discos, com cerca de 150 nm x 1,6 nm. Com relação à estrutura cristalina, os sulfatados são formados por alomorfos de celulose do tipo I e os fosfatados, tipo II. A aplicação de nanocristais de celulose sulfatados não foi capaz de estabilizar as emulsões, por efeito de Ramsden-Pickering mas as estabilizou por alteração da viscosidade da fase contínua, de XG, por mais de 48 h, devido a interações preferenciais entre esta fase com os nanocristais, fenômeno conhecido como depleção. Os nanocristais fosfatados, por outro lado, apresentaram efeito Ramsden-Pickering nas horas iniciais, isso foi atribuído ao seu tipo cristalino, celulose do tipo II, que interage menos com a fase de XG e, talvez, pela diferença de morfologia dos cristais. Adicionalmente, esses cristais também foram capazes de promover pequenas alterações de viscosidade na fase contínua, de XG, aumentando também a estabilidade do sistema, por aproximadamente 48 h. Por fim, foi possível obter nanocristais de celulose com diferentes alomorfos, que foram capazes de estabilizar as emulsões de XG:AMP por diferentes mecanismos. A modulação das interações preferenciais entre XG e NCC pode ser uma estratégia para estabilização das emulsões água-em-água em estudo. Entretanto, ainda há desafios em se tratando de estabilidade de suspensões de nanocristais de celulose, que será aprofundada em estudos futuros.

Palavras-chave: Emulsões água-em-água. Xiloglucana. Amilopectina. Nanocristais de celulose. *Ramsden-Pickering*.

ABSTRACT

Emulsions are systems thermodynamically metastable systems and widely studied in literature, highlighting study of the stability of these systems, which is very important and strategic from a technological and industrial point of view. Another type of emulsion, known as “water-in-water emulsions” has gained notoriety in the literature. They can be obtained from the mixture of macromolecules, such as hydrophilic polysaccharides, which are dispersed in water but incompatible with each other. In this case, stabilization by traditional surfactant molecules cannot be performed, because both polysaccharides are hydrophilic. An alternative for stabilization are the particles, which can partially interact with both phases, migrating to the interface and stabilizing the system by steric effects or other mechanisms. In this present work, a system formed by two polysaccharides, amylopectin and xyloglucan was investigated. The particles studied for the stabilization of this system are cellulose nanocrystals, which have a preferential interaction with xyloglucan, modulated by the sulfate content present on the surface of these crystals. Five types of cellulose nanocrystals were used, four with different levels of sulfate (240; 94; 58 and 23 mmol kg⁻¹) and one phosphated (56 mmol kg⁻¹). They also differ by morphology, the sulfated nanocrystals are rod-shaped, with 150 nm x 5 nm and toroidal aggregates of about 4 µm, whereas phosphates are spherical shapes with 4 µm and disks, 150 nm x 1.6 nm. Regarding the crystalline structure, sulfates are formed by cellulose type I and phosphates, type II. The application of sulphated cellulose nanocrystals was not able to stabilize the emulsions, due to the Ramsden-Pickering effect, but stabilized them by altering the viscosity of the continuous phase, of xyloglucan, for more than 48 h, due to preferential interactions between this phase with the nanocrystals, a phenomenon known as depletion. Phosphate nanocrystals, on the other hand, showed a Ramsden-Pickering effect in the early hours, this was attributed to its crystalline type, type II cellulose, which interacts less with the xyloglucan phase and maybe, due to the difference in morphology of the crystals. In addition, these crystals were also able to promote small changes in viscosity in the continuous phase, also increasing the stability of the system, for approximately 48 h. The modulation of preferential interactions between XG and NCC may be a strategy for stabilizing the water-in-water emulsions under study. However, there are still challenges related to the stability of suspensions of cellulose nanocrystals, which will be analyzed in future studies.

Keywords: Water-in-water emulsions. Xyloglucan. Amylopectin. Cellulose Nanocrystals. Ramsden-Pickering.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1: PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO DE UM SISTEMA BIFÁSICO SEM ESTABILIZANTES. NESSE CASO, A ENERGIA LIVRE DO SISTEMA (COM GOTÍCULAS) AUMENTA, TORNANDO-O TERMODINAMICAMENTE INSTÁVEL.. | 17 |
| FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE POSSÍVEIS INTERAÇÕES ENTRE MACROMOLÉCULAS HIDROFÍLICAS..... | 19 |
| FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DUAS DISPERSÕES COLOIDAIS DE BIOPOLÍMEROS. APÓS A MISTURA, AS PARTÍCULAS, QUE ESTAVAM EM UMA DAS FASES, MIGRAM ATÉ A INTERFACE ESTABILIZANDO ESSES SISTEMAS POR DIVERSOS MECANISMOS..... | 20 |
| FIGURA 4: POSSÍVEIS MECANISMOS DE ESTABILIZAÇÃO PARA EMULSÕES ESTABILIZADAS COM PARTÍCULAS: RECOBRIMENTO DE TODA SUPERFÍCIE (A), FORMAÇÃO DE "PONTE" ENTRE AS PARTÍCULAS (B), REPULSÃO (C) E FORMAÇÃO DE REDE TRIDIMENSIONAL (D)..... | 21 |
| FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA AMILOPECTINA. A CADEIA PRINCIPAL É FORMADA POR UNIDADES DE GLUCOSE, COM LIGAÇÕES 1 → 4 E COM RAMIFICAÇÕES EM 1 → 6..... | 24 |
| FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA XILOGLUCANA. A CADEIA PRINCIPAL É FORMADA POR UNIDADES DE GLUCOSE, COM LIGAÇÕES β(1 → 4), EM PRETO, APRESENTANDO RAMIFICAÇÕES COM XILOSE EM 1 → 6, REPRESENTADO EM VERMELHO E ALGUMAS XILOSES PODEM SER SUBSTITUÍDAS EM 1 → 2 COM GALACTOSE, EM AZUL..... | 25 |
| FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE. A CADEIA É FORMADA POR UNIDADES DE GLUCOSE, COM LIGAÇÕES 1 → 4. AS INTERAÇÕES INTRA E INTERMOLECULARES ESTÃO DESTACADAS COM A LINHA EM VERMELHO..... | 26 |
| FIGURA 8: ILUSTRAÇÃO DAS REGIÕES DA CELULOSE, AMORFA E CRISTALINA. OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE SÃO ISOLADOS A PARTIR DA REMOÇÃO DA REGIÃO AMORFA, ATRAVÉS DA HIDRÓLISE CATALISADA POR ÁCIDO..... | 27 |
| FIGURA 9: ESQUEMA DE TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA, AVALIANDO A VARIAÇÃO DA CONDUTIVIDADE FRENTE A ADIÇÃO DE UMA BASE..... | 39 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 10: GRÁFICOS DAS TITULAÇÕES CONDUTOMÉTRICAS PARA AS AMOSTRAS DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE, COM DIFERENTES TEORES DE SULFATO (NCC-01, D2, S1 E NS) E FOSFATADOS (NCC-PH)..... | 40 |
| FIGURA 11: MECANISMO DA REAÇÃO DE DESSULFATAÇÃO CATALISADA POR ÁCIDO..... | 43 |
| FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FUNCIONAMENTO DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA..... | 45 |
| FIGURA 13: ILUSTRAÇÃO DO EFEITO DE CONVOLUÇÃO. A PONTA DO <i>CANTILEVER</i> É MAIOR QUE A LARGURA DA AMOSTRA (CINZA), A IMAGEM OBTIDA (LINHA PONTILHADA) É MAIS LARGA QUE O ESPERADO. PONTAS MAIS FINAS DIMINUEM ESSE EFEITO, COMO NO DESENHO DA DIREITA..... | 46 |
| FIGURA 14: IMAGENS DE TOPOGRAFIA OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA, EM MODO DE CONTATO INTERMITENTE, DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS E FOSFATADOS DEPOSITADOS EM SUPERFÍCIE DE MICA, NUMA CONCENTRAÇÃO DE 0,020 % (M/M)..... | 47 |
| FIGURA 15: IMAGEM DE TOPOGRAFIA (ESQUERDA) PARA UM NANOCRISTAL DE CELULOSE (NCC-01) E O PERFIL EXTRAÍDO PARA OBTER O VALOR DA ALTURA DO CRISTAL..... | 48 |
| FIGURA 16: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS NCC-01..... | 50 |
| FIGURA 17: POSSÍVEL MECANISMO DE FORMAÇÃO DE TOROIDES A PARTIR DA SECAGEM DE SUSPENSÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE POR <i>SPRAY DRYER</i> | 51 |
| FIGURA 18: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE FOSFATADOS NCC-PH..... | 52 |
| FIGURA 19: LIMITAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) PARA PARTÍCULAS MUITO GRANDES (ORDEM DE MICRÔMETROS). O <i>CANTILEVER</i> É INCAPAZ DE INTERAGIR COM PARTÍCULAS MUITO ALTAS, INTERAGINDO APENAS COM ESTRUTURAS PEQUENAS, COMO NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 52 |
| FIGURA 20: DIFRATOGRAMA DAS AMOSTRAS DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS (NCC-NS, NCC-01, D2 E S1) E FOSFATADOS (NCC-PH) A PARTIR DA CELULOSE MICROCRISTALINA (MCC101)..... | 54 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 21: CONVERSÃO ENTRE CELULOSE TIPO I PARA TIPO II. AS LIGAÇÕES ENTRE OXIGÊNIO 6 E 3, NO TIPO I, SÃO CONVERTIDAS PARA LIGAÇÕES ENTRE 2 E 6, NO TIPO II..... | 55 |
| FIGURA 22: DIAGRAMA DE FASES PARA A MISTURA AQUOSA DE XG E AMP. O CÍRCULO HACHURADO ILUSTRA O PONTO DE TRABALHO DESSE PROJETO. | 57 |
| FIGURA 23: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SEPARAÇÃO ENTRE FASES, PARA MISTURA DE AMP (1,02 % M/M) COM XG (1,30 % M/M), COM QUATRO NANOCRISTAIS (NCC-01, D2, S1 E NS) DE DIFERENTES TEORES DE SULFATO EM QUATRO CONCENTRAÇÕES (0,05; 0,10; 0,15 E 0,20 % M/M). O pH DESSAS EMULSÕES ESTÁ NUMA FAIXA ENTRE 6,5 A 7 E O EXPERIMENTO FOI CONDUZIDO EM UMA TEMPERATURA DE 25 °C..... | 58 |
| FIGURA 24: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SEPARAÇÃO ENTRE FASES, PARA MISTURA DE AMP (1,02 % M/M) COM XG (1,30 % M/M), CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE FOSFATADOS (NCC-PH). O pH DESSAS EMULSÕES ESTÁ EM UMA FAIXA DE 6,5 A 7 E O EXPERIMENTO FOI CONDUZIDO EM UMA TEMPERATURA DE 25 °C. | 59 |
| FIGURA 25: IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER (MCL) OBTIDAS APÓS 1,5 H DE EMULSIFICAÇÃO, EM AUMENTO DE 60X, DAS EMULSÕES DE AMP EM XG (1,02: 1,30% M/M) COM AMP MARCADA COM FITC (VERDE) E QUATRO CONCENTRAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE MARCADOS COM AZUL DO NILO 2,5 PPM (VERMELHO)..... | 60 |
| FIGURA 26: IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL, PARA EMULSÕES DE AMP EM XG (1,02: 1,30% M/M) EVIDENCIANDO QUE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (EM VERMELHO) FICAM INTEGRALMENTE NA FASE DA XILOGLUCANA (EM PRETO), INDICANDO INTERAÇÕES PREFERENCIAIS..... | 61 |
| FIGURA 27: CRESCIMENTO DO DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS DE AMILOPECTINA NA EMULSÃO NA PRESENÇA DE NANOCRISTAIS NCC-01, COMPARADOS COM O CONTROLE, SEM PARTÍCULAS. O DIÂMETRO FOI NORMALIZADO, DIVIDINDO-SE OS DIÂMETROS PELO DIÂMETRO NO TEMPO INICIAL DE CADA AMOSTRA, QUE FOI CONSIDERADO APÓS 10 MIN DO PREPARO DAS EMULSÕES..... | 62 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 28: IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER (MCL) OBTIDAS APÓS 1,5 H DE EMULSIFICAÇÃO, DAS EMULSÕES DE AMP EM XG (1,02: 1,30% M/M) COM AMP MARCADA COM FITC (VERDE) E TRÊS CONCENTRAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE FOSFATADOS, MARCADOS COM AZUL DO NILO 2,5 PPM (VERMELHO)..... | 63 |
| FIGURA 29: PORÇÕES ANFIFÍLICAS DA CADEIA DE CELULOSE. (A) VISTA LATERAL DA CADEIA, EVIDENCIANDO QUE O EIXO AXIAL POSSUI HIDROFOBICIDADE. (B) VISTA SUPERIOR, MOSTRANDO AS LATERAIS COM HIDROXILAS, O QUE TORNA ESSA REGIÃO HIDROFÍLICA..... | 65 |
| FIGURA 30: CURVA DE VISCOSIDADE PARA SUSPENSÕES DE XILOGLUCANA A 1,30 % (M/V) E DUAS CONCENTRAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE, 0,20 E 1,0% (M/V)..... | 67 |
| FIGURA 31: POSSÍVEL FORMAÇÃO DE UNIDADES REOLÓGICAS ENTRE XILOGLUCANA E NANOCRISTAIS DE CELULOSE, AUMENTANDO A VISCOSIDADE DO MEIO. EM ALTAS TAXAS DE CISLHAMENTO ESSA ESTRUTURA É ROMPIDA E EVIDENCIA O COMPORTAMENTO PSEUDOPLÁSTICO..... | 68 |
| FIGURA 32: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM REÔMETRO CONE-PLACA, PARA MEDIÇÃO DA VISCOSIDADE DO SISTEMA. A FORÇA TANGENCIAL APLICADA NA AMOSTRA É CAPAZ DE ROMPER A ESTRUTURA FORMADA..... | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1: RESUMO DOS DADOS DAS HIDRÓLISES DA CELULOSE MICROCRISTALINA PARA OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS (NCC-01 E NCC-NS) E FOSFATADOS (NCC-PH)..... | 39 |
| TABELA 2: RESUMO DOS DADOS DE MASSA E VOLUME DE BASE UTILIZADA, BEM COMO OS VALORES DE REGRESSÃO LINEAR PARA AS CURVAS DE TITULAÇÃO DOS CRISTAIS..... | 42 |
| TABELA 3: RESUMO DOS RESULTADOS DO TEOR DE SULFATO E FOSFATO, OBTIDOS POR TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA PARA NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 43 |
| TABELA 4: RESUMO DE DADOS DA LITERATURA PARA OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE DE DIFERENTES MATERIAIS DE PARTIDA, MORFOLOGIA, DIMENSÕES, RENDIMENTO E CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE..... | 45 |
| TABELA 5: RESUMO DAS DIMENSÕES E MORFOLOGIA DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS (NCC-01, D2 E S1) E FOSFATADOS (NCC-PH), PARA UMA AMOSTRAGEM DE N = 110 NANOCRISTAIS..... | 49 |
| TABELA 6: DADOS, OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO, PARA OS POLISSACARÍDEOS: XILOGLUCANA E AMILOPECTINA... | 57 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 | EMULSÕES: ASPECTOS GERAIS..... | 16 |
| 1.2 | EMULSÕES ÁGUA-EM-ÁGUA..... | 18 |
| 1.3 | BIOPOLÍMEROS..... | 23 |
| 1.3.1 | Amilopectina (AMP)..... | 23 |
| 1.3.2 | Xiloglucana (XG)..... | 24 |
| 1.3.3 | Celulose..... | 25 |
| 2 | OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 30 |
| 3.1 | ISOLAMENTO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS..... | 30 |
| 3.2 | ISOLAMENTO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE FOSFATADOS..... | 31 |
| 3.3 | DESSULFATAÇÃO DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 31 |
| 3.4 | QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE SULFATO E FOSFATADO DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 32 |
| 3.5 | ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 33 |
| 3.5.1 | Microscopia de Força Atômica (MFA)..... | 33 |
| 3.5.2 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 34 |
| 3.5.3 | Difração de Raios-X em pó (DRX)..... | 34 |
| 3.6 | CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS (AMP E XG)..... | 34 |
| 3.7 | ANÁLISE DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS CRISTAIS SULFATADOS E FOSFATADOS SOBRE A ESTABILIDADE DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA EM XILOGLUCANA..... | 35 |
| 3.8 | AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS EMULSÕES..... | 36 |
| 3.9 | AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE DE AMOSTRAS DE XILOGLUCANA COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 36 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 37 |
| 4.1 | ISOLAMENTO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 37 |
| 4.2 | TEORES DE SULFATO E FOSFATO DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 38 |
| 4.2.1 | Titulação das amostras de nanocristais de celulose..... | 40 |
| 4.3 | ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 43 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.1 | Análise por microscopia de força atômica (MFA)..... | 45 |
| 4.3.2 | Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 49 |
| 4.3.3 | Difração de Raios-X (DR-X) dos nanocristais em pó..... | 53 |
| 4.4 | CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS – AMILOPECTINA (AMP) E XILOGLUCANA (XG)..... | 55 |
| 4.5 | DIAGRAMA DE FASES..... | 56 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS EMULSÕES COM NANOCRISTAIS SULFATADOS E FOSFATADOS..... | 57 |
| 4.7 | AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS EMULSÕES COM NANOCRISTAIS SULFATADOS E FOSFATADOS..... | 60 |
| 4.8 | AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE DA XILOGLUCANA NA PRESENÇA DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE..... | 66 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 69 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 71 |
| 7 | REFERÊNCIAS..... | 72 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 EMULSÕES: ASPECTOS GERAIS

Emulsões são dispersões termodinamicamente instáveis (metaestáveis) de dois líquidos imiscíveis, como óleo e água, por exemplo. A instabilidade dessas misturas pode estar relacionada a diversos motivos, como: 1) a elevada tensão interfacial; 2) a diferença de densidade entre as fases, promovendo a cremação ou sedimentação; 3) a diferença de pressão interna das gotículas (envelhecimento de Ostwald); 4) a resultante da somatória entre os potenciais de atração e repulsão de fases dispersas liofóbicas. Esses sistemas podem ser metaestabilizados por moléculas de tensoativos, chamados de emulsificantes, e também por partículas, que podem evitar a separação de fases, de forma parcial, pela redução da tensão interfacial, no caso de surfactantes, e/ou por criar um potencial repulsivo ou estérico interfacial, além da possibilidade de alteração de viscosidade de uma das fases, promovendo a estabilidade cinética (COSGROVE, 2010).

A estabilidade também pode ser avaliada em termos de energia livre de Gibbs (ΔG), composta por um fator entálpico (ΔH) e outro entrópico (ΔS), como demonstra a equação (1):

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1)$$

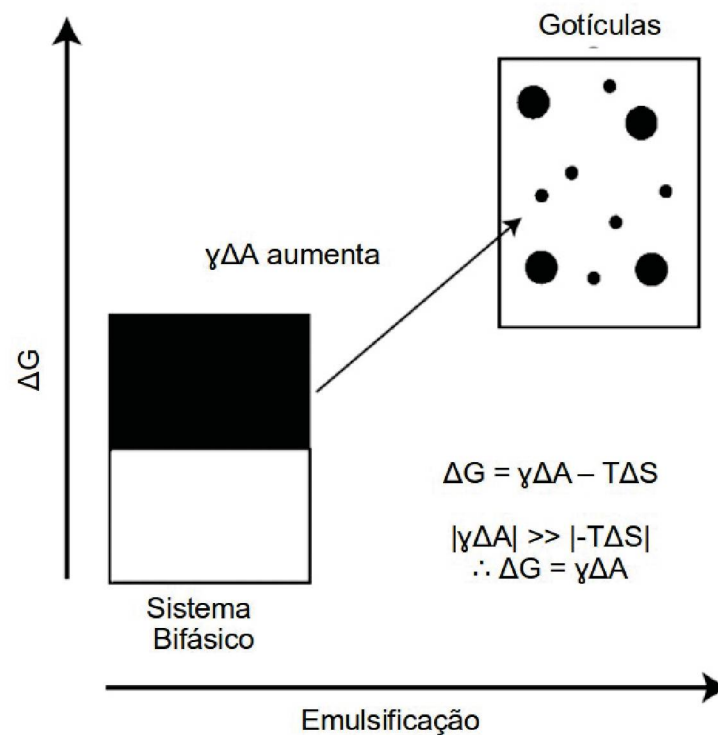
O fator entálpico (ΔH) é diretamente proporcional à diferença de área interfacial no sistema (ΔA). Portanto, é possível fazer uma aproximação na equação (1), considerando a variação da entalpia como o produto da tensão interfacial (γ) pela variação da área interfacial ($\gamma \Delta A$). Após emulsificação, há sempre um aumento na área superficial (ΔA) fazendo com que o termo seja positivo. Por outro lado, a entropia do sistema ($-T \Delta S$) é sempre negativa, pois o número de arranjos acessíveis às gotículas é muito maior que no estado não emulsionado. Porém, em termos de grandeza, o parâmetro de área interfacial ($\gamma \Delta A$) é muito mais expressivo que o termo entrópico ($-T \Delta S$) (MCCLEMENTS, 2004). Isso faz com que, na ausência de surfactantes ou partículas, a variação de entropia possa ser omitida e o termo $T \Delta S$

possa ser ignorado da equação (BINKS e HOROZOV, 2006; COSGROVE, 2010). A energia pode, então, ser resumida como mostra a equação (2):

$$\Delta G = \gamma \Delta A \quad (2)$$

Após a emulsificação, a área superficial aumenta com a formação de gotículas e o termo ΔA é sempre positivo, isso faz com que o sistema aumente em energia, tornando-se termodinamicamente instável. Esse processo é exemplificado na FIGURA 1.

FIGURA 1: PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO DE UM SISTEMA BIFÁSICO SEM ESTABILIZANTES. NESSE CASO, A ENERGIA LIVRE DO SISTEMA (COM GOTÍCULAS) AUMENTA, TORNANDO-O TERMODINAMICAMENTE INSTÁVEL.



FONTE: Adaptado de Binks & Horozov (2006).

Sistemas com estabilizantes (sejam partículas ou surfactantes) apresentam uma termodinâmica mais complexa. Surfactantes, por exemplo, diminuem a tensão interfacial do sistema, tornando a variação de energia livre menos positiva. Já as

partículas sólidas não geram alteração significativa na tensão interfacial do sistema (WANG et al., 2004) e sua estabilização é dada por outros mecanismos que serão detalhados no decorrer do trabalho.

1.2 EMULSÕES ÁGUA-EM-ÁGUA

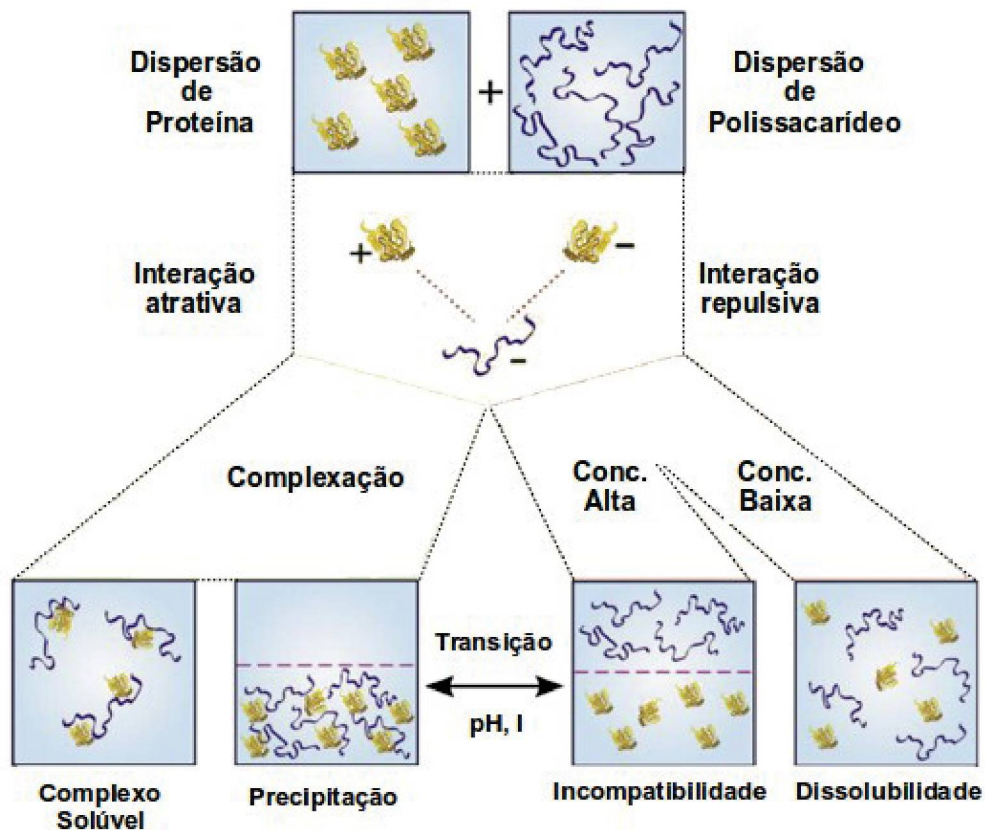
Emulsões também podem ser formadas por duas fases aquosas nas quais são dispersas macromoléculas incompatíveis entre si e tais sistemas são conhecidos como emulsões água-em-água (ESQUENA, 2016). Os primeiros estudos de sistemas bifásicos aquosos datam do final do século 19. Beijerinck, em 1896, descobriu que misturas de gelatina e amido solúvel, em água, formavam uma amostra turva que, após certo tempo de repouso, separava em duas fases líquidas. A água é um bom solvente para alguns sistemas de biopolímeros, contudo, pode existir, entre as moléculas dos polímeros, uma incompatibilidade termodinâmica que conduz a uma separação de fases (imiscibilidade) que é indesejada em alguns casos e associada à instabilidade de formulações.

No caso de emulsões água-em-água, a separação das fases pode ser segregativa e/ou associativa, dependendo de repulsão ou atração entre os dois polímeros hidrofílicos, além de ligações de hidrogênio entre o polímero e água. A separação de fase segregativa é observada em várias misturas de dois componentes hidrofílicos. Em pequenas concentrações de polímeros a mistura consiste visualmente em uma única fase na qual coexistem os dois polímeros dispersos. Contudo, acima de uma concentração mínima, os compostos se separam em duas fases imiscíveis, em equilíbrio termodinâmico, onde cada uma das fases é rica em um respectivo componente. A separação de fase associativa é um fenômeno diferente, no qual uma mistura de componentes sofre sedimentação quando a concentração dos polímeros é alta e o sobrenadante é uma pequena fração dos polímeros. Esse tipo de separação, associativa, ocorre comumente por complexação eletrostática na presença de polímeros de cargas opostas. O precipitado consiste de um sólido amorfo, usualmente chamado de coacervado (MATALANIS et al., 2011).

Através da representação esquemática da FIGURA 2, é possível observar claramente as incompatibilidades citadas anteriormente. Além disso, é interessante

notar que o pH e a força iônica da solução podem influenciar nas separações segregativas ou associativas, promovendo transições entre elas.

FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE POSSÍVEIS INTERAÇÕES ENTRE MACROMOLÉCULAS HIDROFÍLICAS.



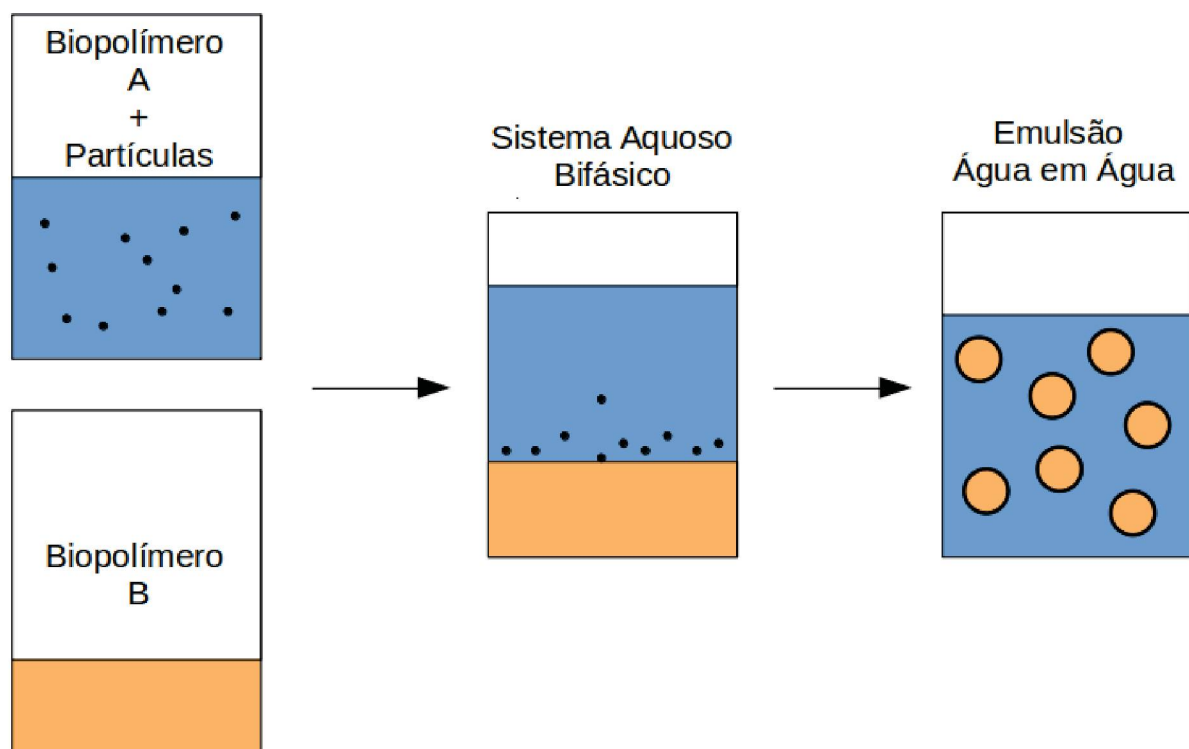
FONTE: Adaptado de Matalanis et al. (2011).

A termodinâmica desses processos pode ser analisada em termos da energia livre de mistura, qualitativamente, através da clássica equação $\Delta_{mis}G = \Delta_{mis}H - T \Delta_{mis}S$. No caso de polímeros neutros, a incompatibilidade termodinâmica entre os componentes é devida à entropia ($\Delta_{mis}S$) negativa da mistura, que promove um aumento de energia ($\Delta_{mis}G > 0$) do sistema (ESQUENA, 2016). Para polímeros que possuem cargas, como ilustrado na FIGURA 2, as mesmas são determinantes para prever se as interações serão favoráveis ou não. Quando apenas um dos polímeros é carregado, a termodinâmica torna-se um pouco mais complexa, e a entropia dos contraíons também deve ser levada em consideração. Nesse caso,

quando a força iônica do meio é baixa, a entropia torna-se um fator determinante para formação de apenas uma fase (FRITH, 2010).

Além disso, as condições para separação de fase variam de acordo com as propriedades das macromoléculas, como massa molar, conformação, além das variáveis das dispersões, como concentração, pH, força iônica e temperatura (CAPRON et al., 2001). Uma alternativa para se estabilizar essas emulsões são partículas sólidas, como ilustra a FIGURA 3.

FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DUAS DISPERSÕES COLOIDAIS DE BIOPOLÍMEROS. APÓS A MISTURA, AS PARTÍCULAS, QUE ESTAVAM EM UMA DAS FASES, MIGRAM ATÉ A INTERFACE ESTABILIZANDO ESSES SISTEMAS POR DIVERSOS MECANISMOS.

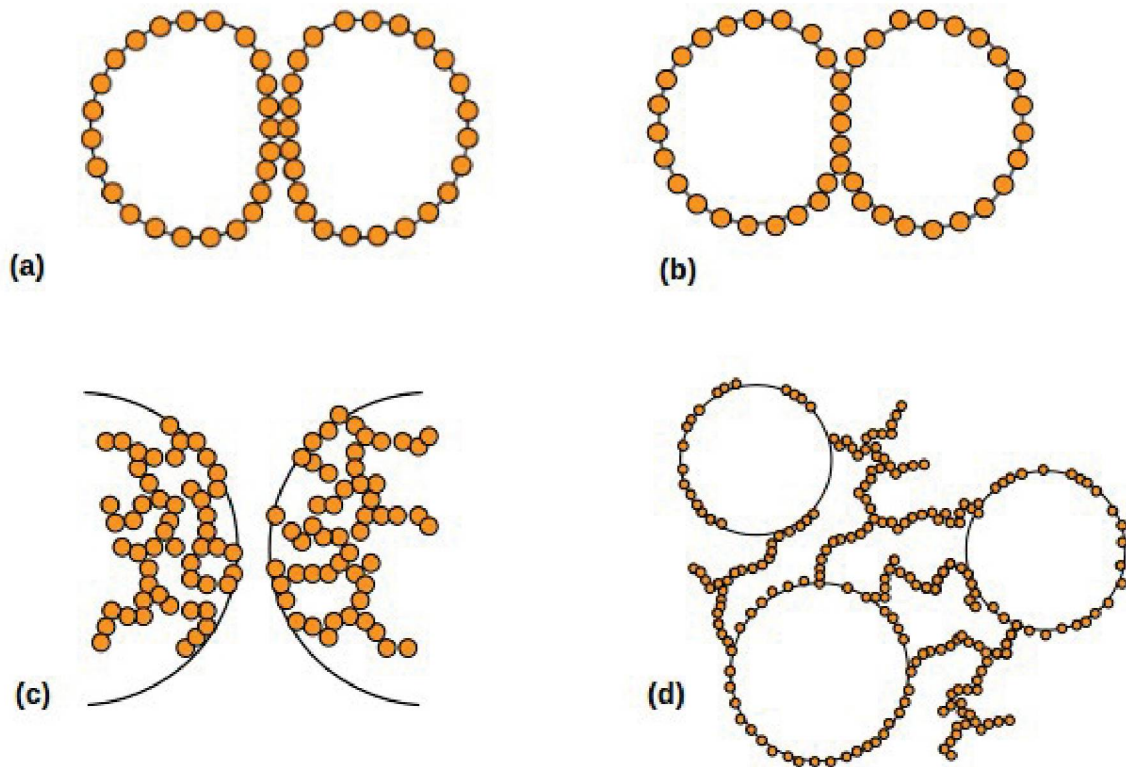


FONTE: O autor (2019).

O primeiro estudo de estabilização de emulsões com partículas foi realizado por Ramsden, em 1903. Contudo, anos mais tarde, Pickering, conduziu outro estudo sobre o tema, sendo reconhecido pelo trabalho e hoje, emulsões estabilizadas por partículas recebem o epônimo de “emulsões de *Pickering*”. Entretanto, as emulsões estabilizadas com partículas adsorvidas na interface serão denominadas, neste trabalho, em homenagem ao primeiro a observar o fenômeno, de “emulsões de *Ramsden-Pickering*”.

O mecanismo de estabilização por partículas é diferente da estabilização por surfactantes, e pode ocorrer de várias maneiras (BINKS e HOROZOV, 2006), como ilustra a FIGURA 4.

FIGURA 4: POSSÍVEIS MECANISMOS DE ESTABILIZAÇÃO PARA EMULSÕES ESTABILIZADAS COM PARTÍCULAS: RECOBRIMENTO DE TODA SUPERFÍCIE (A), FORMAÇÃO DE "PONTE" ENTRE AS PARTÍCULAS (B), REPULSÃO (C) E FORMAÇÃO DE REDE TRIDIMENSIONAL (D).



FONTE: Adaptado de Binks e Horozov (2006).

As partículas que se aderem à interface das gotículas, evitam a coalescência, como apresentado na FIG. 4 (a), isso pode ocorrer pelo fato das partículas apresentarem carga ou até mesmo devido a um impedimento estérico e há também a possibilidade da formação de uma "ponte" entre as interfaces das gotículas, como ilustra a FIG. 4 (b). Para estabilização, a superfície da gotícula não precisa estar completamente recoberta, como é mostrado na FIG. 4 (c), podem existir forças repulsivas entre as partículas, o que é suficiente para evitar a coalescência. Outra possibilidade, ilustrada na FIG. 4 (d), é a de formação de redes entre as partículas da interface, impossibilitando que as gotículas coalesçam.

Existe uma variedade de partículas, em se tratando de morfologia e tamanho, que podem ser utilizadas para a estabilização de emulsões. VIS et al.

(2015), por exemplo, analisaram a estabilização de emulsões água-em-água através do mecanismo *Ramsden-Pickering* utilizando partículas coloidais com uma morfologia de nanoplaquetas, constatando que boa parte da interface consegue ser ocupada por essas partículas, independente do ângulo de contato.

A influência da morfologia das partículas de proteína também já foi relatada por Gonzalez-Jordan et al. (2016). A partir da mesma molécula podem ser obtidas várias formas de partículas, tais como agregados, fibrilas, microgéis e agregados fractais. Trabalhos recentes foram publicados utilizando diversos tipos de partículas estabilizando emulsões, como partículas do soro do leite (principalmente β -lactoglobulina) em sistemas de poli(óxido de etileno) (PEO)/Dextrana, como mostram Nguyen et al. (2013) e Balakrishnan et al. (2012). Microgéis sensíveis ao pH também foram estudados como estabilizantes, os quais adsorvem-se espontaneamente na interface em determinados valores de pH (NGUYEN et al., 2015). Outras partículas, como nanoplaquetas de montmorilonita também foram utilizadas para estabilizar sistemas de PEO com pulunano (GANLEY et al., 2017).

Outro trabalho, reportado por de Freitas et al. (2016) evidenciou que, misturas polissacarídeos neutros, amilopectina (AMP) e xiloglucana (XG) proveniente de sementes de *H. courbaril* (Jatobá), apresentam uma separação de fases do tipo segregativa. Em emulsões onde a fase dispersa é a AMP, esse sistema pode ser estabilizado com partículas, microgéis, de β -lactoglobulina. O trabalho também mostra que existe uma dependência do pH da emulsão e quando $\text{pH} \leq 5$, exatamente no ponto isoelétrico da proteína, o sistema é estabilizado pelo mecanismo de *Ramsden-Pickering*. Em pH mais alto há uma forte interação das partículas com a fase de AMP e com isso as partículas não migram para a interface do sistema. Além disso, outro resultado interessante desse trabalho relata que partículas podem ser funcionalizadas, com um polissacarídeo por exemplo, modulando assim a interação com as fases e possibilitando a estabilidade das emulsões.

Hazt et al. (2020) também utilizaram um sistema formado por AMP e XG, contudo esse último polissacarídeo foi obtido de sementes de Tamarindo, diferenciando-se em algumas propriedades como massa molar, 32 vezes menor do estudado por de Freitas et al. (2016). Nesse trabalho, o diagrama de fases, entre AMP e XG de Tamarindo, foi construído, o que possibilitou saber em quais

concentrações de polissacarídeos há separação de fases, bem como qual tipo de emulsão é obtido (AMP em XG, ou o contrário). Para a estabilização desse sistema, foram utilizadas partículas de proteína isolada do soro do leite (conhecidas como WPI, do inglês *Whey Protein Isolate*). Foi observado, nesse trabalho, efeito *Ramsden-Pickering* em pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas. Além disso, foram utilizadas partículas híbridas de WPI-XG que ocasionaram a geleificação da fase contínua, mesmo em pH acima do ponto isoelétrico da proteína, estabilizando assim as emulsões.

Por fim, é evidente que o tema de emulsões água-em-água é muito amplo, seja pela possibilidade de utilizar uma ampla combinação de polímeros que apresentam separação de fases ou pela variedade de partículas que podem ser utilizadas para sua estabilização.

1.3 BIOPOLÍMEROS

Como citado anteriormente, emulsões água-em-água podem ser formadas por misturas de biopolímeros. Tendo em vista as contribuições de trabalhos anteriores (DE FREITAS et al., 2016; HAZT et al., 2020), o sistema formado por AMP e XG, originada de sementes de Tamarindo, foi escolhido como objeto de estudo nesse trabalho. Ambos os polissacarídeos serão detalhados nas próximas seções.

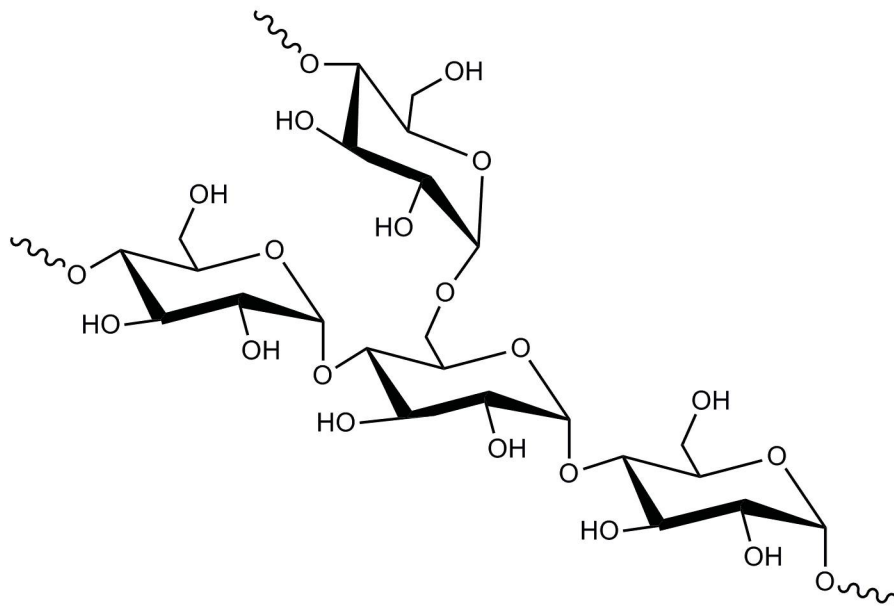
1.3.1 Amilopectina (AMP)

A AMP é um polissacarídeo encontrado no amido e desempenha o papel de reserva de energia em várias espécies de tubérculos como batata e endospermas dos grãos de cereais (SMITH, 2001), sendo assim, presente em vários alimentos. A estrutura da AMP está esquematizada na FIGURA 5.

O amido é composto por uma mistura de dois polissacarídeos: amilose, de cadeia linear, e AMP, com cadeia ramificada. A cadeia principal de AMP é composta por unidades de α -D-glucose, conectadas por ligações 1 \rightarrow 4 entre si e por ligações 1 \rightarrow 6, formando as ramificações na cadeia principal.

Essa estrutura altamente ramificada é responsável pelas propriedades reológicas desse polissacarídeo (TESTER et al., 2004).

FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA AMILOPECTINA. A CADEIA PRINCIPAL É FORMADA POR UNIDADES DE GLUCOSE, COM LIGAÇÕES 1 → 4 E COM RAMIFICAÇÕES EM 1 → 6.



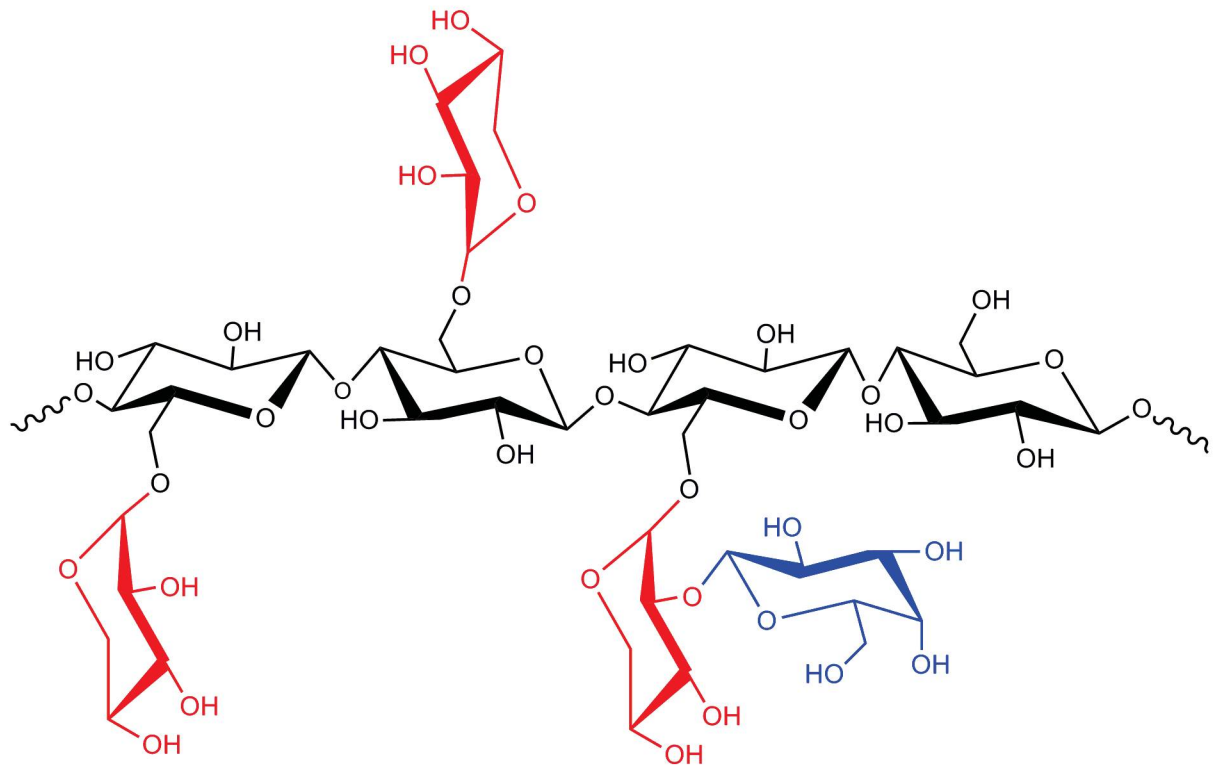
FONTE: Adaptado de Smith (2004).

1.3.2 Xiloglucana (XG)

A XG é um polissacarídeo de reserva, encontrando em endospermas de sementes de algumas espécies como o Tamarindo (*Tamarindus indica*), Jatobá (*Hymenaea courbaril*), dentre outras. Também é encontrado, em uma quantidade de 20 a 25 % em células de paredes primárias de algumas dicotiledôneas (MCNEIL, 1984). Sua estrutura é formada por uma cadeia linear, composta por unidades de β -D-glucose, com ligações 1 → 4. Há também ramificações com unidades de α -D-xilose, ligadas em 1 → 6 e também pode apresentar algumas unidades de β -D-galactose, ligadas 1 → 2 com xilose (HAYASHI, 1989). A estrutura esquemática das ligações da XG estão representadas na FIGURA 6.

Como citado anteriormente, a mistura entre XG e AMP forma um sistema em que há separação de fases, ou seja, é um sistema que pode ser classificado como emulsão água-em-água. Ambos os polissacarídeos podem ser explorados como uma aplicação em alimentos, mas para isso essa mistura deve ser estudada do ponto de vista de estabilidade da emulsão formada.

FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA XILOGLUCANA. A CADEIA PRINCIPAL É FORMADA POR UNIDADES DE GLUCOSE, COM LIGAÇÕES $\beta(1 \rightarrow 4)$, EM PRETO, APRESENTANDO RAMIFICAÇÕES COM XILOSE EM $1 \rightarrow 6$, REPRESENTADO EM VERMELHO E ALGUMAS XILOSES PODEM SER SUBSTITUÍDAS EM $1 \rightarrow 2$ COM GALACTOSE, EM AZUL.



FONTE: Adaptado de Cosgrove (2015).

Estudos anteriores mostram que outro polissacarídeo, a celulose, interage com a XG e essa interação é modulada pelo teor de sulfato presente na superfície de nanocristais de celulose (KITTLE et al., 2018; PIRICH et al., 2015).

Por conseguinte, nanocristais de celulose são partículas com potencial aplicação na estabilidade de emulsões, como água-em-água. Além disso, outros estudos relatam a importância da massa molar da XG na interação com nanocristais de celulose, mostrando que, quanto maior a massa molar, maior a interação entre os polissacarídeos (TALANTIKITE et al., 2019).

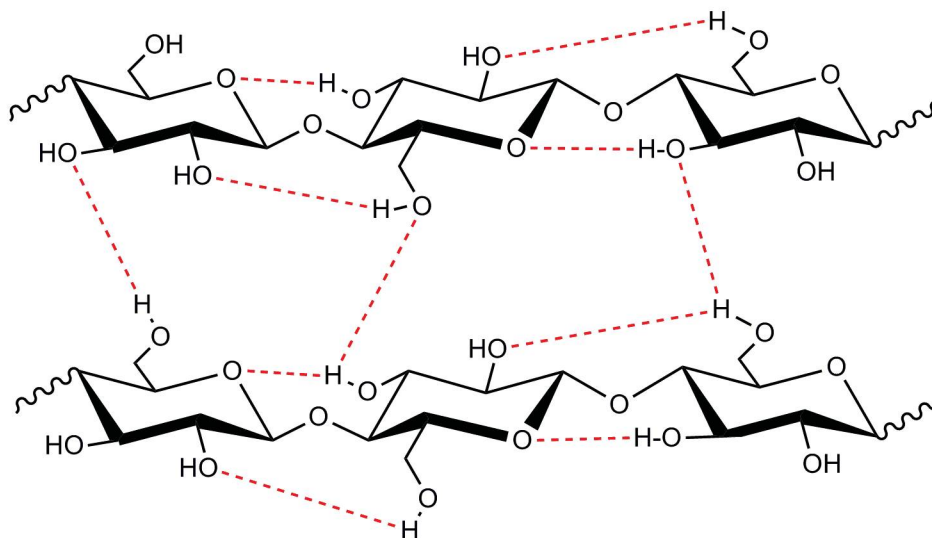
1.3.3 Celulose

A celulose é o biopolímero mais conhecido, sendo encontrado em uma ampla variedade de fontes, como plantas, alguns animais marinhos e algumas

bactérias. Em boa parte deles, sua função é de material de reforço, como no caso de plantas, onde a celulose é componente da parede celular (AZIZI SAMIR et al., 2005).

Sua estrutura é composta de unidades de β -D-glucose, com ligações 1 \rightarrow 4, formando cadeias lineares. Devido ao grande número de hidroxilas presentes em sua estrutura, as cadeias de celulose podem apresentar interações intra e intermoleculares, como mostra a FIGURA 7 (SAMIR et al., 2005; VISAKH e THOMAS, 2010). Essas interações também são responsáveis pelo polimorfismo da celulose, ou seja, as cadeias podem se organizar de maneiras distintas dando origem a diferentes estruturas de celulose, como a celulose tipo I, II, III e IV (KOVALENKO, 2010)

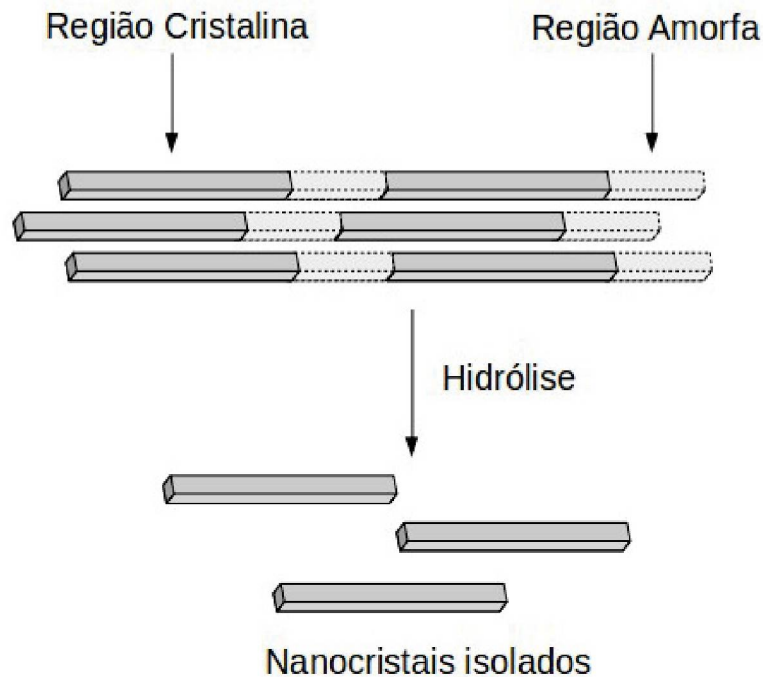
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE. A CADEIA É FORMADA POR UNIDADES DE GLUCOSE, COM LIGAÇÕES 1 \rightarrow 4. AS INTERAÇÕES INTRA E INTERMOLECULARES ESTÃO DESTACADAS COM A LINHA EM VERMELHO.



FONTE: Adaptado de Visakh e Thomas (2010).

Outra característica da celulose é a existência de regiões de alto ordenamento de suas cadeias, formando regiões cristalinas. Por outro lado, há também regiões com um menor ordenamento, dando origem a regiões amorfas. A região cristalina pode ser isolada através de uma hidrólise, catalisada por ácido, da região amorfa, como ilustrado na FIGURA 8. Isso pode ser feito através de ácidos, como o sulfúrico (LU e HSIEH, 2010), fosfórico (CAMARERO-ESPINOSA et al., 2013) ou clorídrico (YU et al., 2013).

FIGURA 8: ILUSTRAÇÃO DAS REGIÕES DA CELULOSE, AMORFA E CRISTALINA. OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE SÃO ISOLADOS A PARTIR DA REMOÇÃO DA REGIÃO AMORFA, ATRAVÉS DA HIDRÓLISE CATALISADA POR ÁCIDO.



FONTE: O autor (2019).

A hidrólise catalisada por ácido possui algumas variáveis, como temperatura, concentração do ácido, tempo de reação e relação ácido/massa. Todas elas influenciam no rendimento final, bem como na carga e outros fatores estruturais e morfológicos da região cristalina remanescente. Há trabalhos que visam a otimização de processos e estabelecem condições ótimas para reações, como reporta Bondeson et al. (2006).

No caso de uma hidrólise a partir de celulose de origem vegetal, foram investigados a concentração do ácido, temperatura e tempo de hidrólise e através de tratamento estatístico, por design experimental, foram determinadas as melhores condições para otimização do rendimento e carga residual da suspensão final, a conclusão leva a valores de 57 – 58 % (m/m) para concentração do ácido sulfúrico, temperatura entre 64 – 67 °C e 134 a 156 minutos de reação, com uma densidade residual de grupamentos sulfatos entre 241 a 265 mmol kg⁻¹ (DONG et al., 2016).

Entretanto, para a celulose microcristalina (outro material de partida) também foram determinados as melhores condições para hidrólise ácida, como

demonstram Bondeson et al. (2006), levando em consideração cinco variáveis: (1) concentração de celulose microcristalina, (2) concentração de ácido sulfúrico, (3) tempo, (4) temperatura de hidrólise e também o (5) tempo de sonicação. Nesse caso, as melhores condições de hidrólise foram, 10 g (celulose microcristalina) / 100 mL de solução ácida, cuja concentração do ácido é de 63,5 % (m/m), durante 130 minutos, em uma temperatura de 44 °C com tempo de sonicação de 30 minutos.

A região cristalina, remanescente da hidrólise, consiste em cristais de celulose de escala nanométrica e são reportados na literatura como nanocristais de celulose, cristalitos de celulose ou *whiskers*. Esses cristais são amplamente estudados devido a suas propriedades físicas como rigidez, espessura e comprimento (EICHHORN, 2011)

Os nanocristais de celulose também são materiais promissores para estabilização de emulsões água-em-água. O estudo de Peddireddy et al. (2016) foi o primeiro relato do uso de nanocristais de celulose para estabilizar uma emulsão de dextrana com PEO. Nesse sistema, os nanocristais interagem, preferencialmente, com a fase de dextrana. Também foi observado que, na presença de determinadas quantidades de cloreto de sódio, há gelificação da fase contínua, aumentando a estabilidade das emulsões, através do aumento de viscosidade, inibindo a coalescência do sistema.

Assim, com base no que foi apresentado, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a estabilização de emulsões água-em-água do sistema formado pelos polissacarídeos AMP e XG, levando em consideração que nanocristais de celulose podem ser utilizados como partículas para a estabilização desse sistema, uma vez que interagem, de acordo com seu teor de sulfato, com a fase de XG. Posto isso, amostras de nanocristais de celulose, com diferentes teores de sulfato e, adicionalmente, uma amostra de nanocristal fosfatado foram isoladas e avaliadas como partículas para estabilização desse sistema de polissacarídeos. A estabilidade coloidal e o efeito *Ramsden-Pickering* dessas emulsões foram avaliados através da separação de fases por ensaios macro e microscópicos. A hipótese deste trabalho é que interações preferenciais de nanocristais de celulose e XG sejam moduladas pelo teor de sulfato dos cristais, favorecendo a formação de emulsões estabilizadas pelo efeito *Ramsden-Pickering*. Adicionalmente, nanocristais de celulose fosfatados também foram avaliados e comparados aos sulfatados.

2 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento de emulsões do tipo água-em-água com o sistema de dois biopolímeros: XG e AMP, estabilizadas através do mecanismo de *Ramsden-Pickering*, utilizando partículas de nanocristais de celulose hidrolisadas a partir da celulose microcristalina, com diferentes teores de sulfato e/ou fosfato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar nanocristais de celulose, com diferentes graus de sulfato ou fosfato, a partir de hidrólise de celulose microcristalina. Utilizando técnicas de titulação, para determinação de teor de sulfato, microscopia de força atômica, varredura para avaliação morfológica e difração de raios-X para a determinação da cristalinidade, microestrutural;
- Analisar o efeito da concentração e o grau de sulfatação dos cristais sobre a estabilidade das emulsões formadas, através de análises macroscópicas e também por microscopia confocal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS

Os nanocristais de celulose sulfatados (NCC-01) foram obtidos a partir da celulose microcristalina (Blanver® MC-101, lote: 115012287). Resumidamente, uma massa de 10,0 g desse material, seco, foi pesada e adicionada em uma solução de 100 mL de ácido sulfúrico (64 % m/m) previamente aquecida à temperatura de 45 °C. A reação ocorreu por 2,5 h, sob agitação mecânica com haste de politetrafluoroetileno (PTFE) em um balão de três bocas, imerso em banho de água. Após o tempo determinado, a reação foi interrompida submergindo parcialmente o balão em banho de gelo e um volume de, aproximadamente, 1 L de água gelada (4 °C) foi adicionado ao meio.

A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 11.000 *g*, numa temperatura de 20 °C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado suspenso novamente em água destilada e submetido a nova centrifugação, esse processo foi repetido por três vezes. Após centrifugação as suspensões foram dialisadas, contra água destilada, em membranas de diálise de celulose (*Sigma-Aldrich*, 76 mm – D9402) com *cut-off* de 12 – 14 kDa, durante três dias, com trocas diárias de água, o pH e a condutividade tanto das amostras quanto da água foram monitorados.

Após diálise, as amostras foram secas por aspersão, através de *Spray Dryer*. Para essa técnica, a amostra com aproximadamente 500 mL foi diluída com água destilada até um volume de aproximadamente 1,50 L, a secagem foi realizada no equipamento MSD 1.0 (LabMaq®) numa vazão de 0,40 L h⁻¹, com atomizador de \varnothing 1,0 mm em temperatura de entrada de 175 °C e saída a 110 °C. As condições da hidrólise foram adaptadas da metodologia utilizada por Bondeson et al. (2006).

Outro lote de nanocristais de celulose sulfatados (NCC-NS) também foram isolados seguindo exatamente a mesma metodologia. A única diferença para esses cristais é que os mesmos não passaram por etapa de secagem, sendo mantidos sempre em suspensão, sob refrigeração, após a diálise.

3.2 ISOLAMENTO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE FOSFATADOS

Os nanocristais fosfatados (NCC-PH) também foram obtidos a partir da celulose microcristalina (Blanver® MC-101, lote: 115012287). Cerca de 5,0 g desse material seco foi pesado e adicionado em uma solução de 60 mL de ácido fosfórico (85 % v/v), previamente aquecida à temperatura de 48 °C, em um balão de três bocas, sob agitação mecânica. Nessa condição de temperatura a agitação não era eficiente devido à viscosidade do meio reacional, sendo assim elevada até 58 °C, o que melhorou a homogeneização do meio. A reação ocorreu por 1,5 h, em banho de água. Para interrompê-la, foram adicionados cerca de 700 mL de água gelada (4 °C) e o balão foi submerso em banho de gelo.

A suspensão foi centrifugada, dialisada e seca nas mesmas condições dos nanocristais sulfatados, como descrito na seção 3.1. As condições reacionais, nesse caso, foram adaptadas de Camarero-Espinosa et al. (2013).

3.3 DESSULFATAÇÃO DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE

As reações de dessulfatação parcial foram realizadas mediante a catálise ácida e a dessulfatação total através de solvólise. Ambas as metodologias foram adaptadas de Jiang et al. (2010).

Para dessulfatação parcial, uma massa de 1,00 g de nanocristais sulfatados secos (NCC-01) foram suspensos em 200 mL de água destilada. Sob agitação, em um balão de três bocas, foram adicionados 2,5 mL de uma solução de ácido clorídrico (1,0 mol L⁻¹). O meio reacional foi aquecido até a temperatura de 65 °C, mantido em banho de água, por 3 h. Para interromper a reação, o balão foi submerso parcialmente em banho de gelo, por alguns minutos. Após resfriamento, a suspensão foi submetida à diálise em membranas de celulose (Sigma-Aldrich, 76 mm – D9402) com *cut-off* de 12 –14 kDa, para remoção do ácido em excesso. A diálise durou cerca de 5 dias, com trocas diárias de água.

Finalizada a diálise, a suspensão teve sua concentração determinada gravimetricamente e posteriormente titulada para quantificação do teor de sulfato, como descrito na seção 3.4. A amostra foi submetida novamente ao processo, até obter um teor de sulfato desejado.

Após diálise, a amostra foi seca, por aspersão, em *Spray Dryer* adaptado de um leito fluidizado, com vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de entrada de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e saída $40 \text{ }^\circ\text{C}$ com atomizador de $\varnothing 1,0 \text{ mm}$. Esses cristais foram nomeados de NCC-D2.

Para a solvólise, uma massa de 500 mg de NCC-01 foi suspensa em 200 mL de água destilada e eluída por uma coluna troca catiônica, com resina de poliestireno gel com divinilbenzeno (Purolite® C100) na forma H^+ , previamente ativada. Após eluição de toda suspensão, $30 \text{ } \mu\text{L}$ de piridina foram adicionados e após 1 h de agitação o material foi liofilizado. Após seco, ao material foram adicionados 45 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), sonicados (6 min em 30% de amplitude, *Sonics Vibra Cell*®) e 5 mL de metanol foram adicionados. A suspensão foi aquecida até $72 \text{ }^\circ\text{C}$ e mantida sob agitação por $2,5 \text{ horas}$. A reação foi interrompida adicionando 100 mL de água fria ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) e o balão foi imergido parcialmente em banho de gelo. A suspensão foi colocada em diálise como as anteriores. Os cristais foram nomeados como NCC-S1 e mantidos em suspensão.

Todas as amostras tiveram seu teor de sulfato quantificado através de titulação condutométrica, como mostra a metodologia descrita na seção 3.4.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE SULFATO E FOSFATADO DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE

A quantificação do teor de sulfato foi realizada através de titulações condutométricas, com metodologia adaptada de Beck et al. (2015). Para os nanocristais secos, cerca de 20 a 40 mg foram pesados e suspensos em água destilada, numa concentração final, aproximadamente, de $0,5 \%$ (m/m). Já os nanocristais em suspensão foram pesados e sua massa quantificada através da concentração. As suspensões de nanocristais foram sonicadas por 30 s e, por fim, eluídas através de uma coluna de troca catiônica (Purolite® C100) na forma H^+ , previamente ativada. Após o pré-tratamento, uma solução de cloreto de sódio foi adicionada às suspensões, até que a condutividade alcançasse um valor de $\sim 140 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ e as amostras foram tituladas com solução padronizada de NaOH. As titulações foram realizadas através do titulador automático Stabino® e também com os condutivímetros Analion C708 e MS Tecnopon® mCA 150.

O cálculo do teor de sulfato (σ_{sulfato}) leva em consideração o volume da base, sua concentração e sabendo a massa inicial de nanocristais, o teor de sulfato pode ser quantificado através da equação 3 e o percentual de enxofre (%S), da equação 4.

$$\sigma_{\text{Sulfato}} = \frac{C_{\text{NaOH}} V_1}{m_{\text{NCC}}} \quad (3)$$

$$\%S = \sigma_{\text{Sulfato}} \times M_w(S) \times 100 \quad (4)$$

Sendo, C_{NaOH} = concentração de hidróxido de sódio (mol L^{-1}), V_1 = volume de hidróxido de sódio (L), m_{NCC} = massa de nanocristais de celulose (g), $M_w(S)$ = massa molar do enxofre (g mol^{-1}).

3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE

3.5.1 Microscopia de Força Atômica (MFA)

Para as imagens de microscopia de força atômica (MFA), 100 μL das suspensões de nanocristais de celulose, na concentração de 0,020 % (m/m) foram depositados em substratos de mica (2x2 cm) e ficaram em repouso por 60 s. Em seguida, submetidos a técnica de *spin-coating* (1600 RPM por 20 s). Esse procedimento é repetido mais uma vez, aplicando ao todo 200 μL de amostra.

As imagens foram obtidas através do equipamento *Agilent Scanning Probe Microscope*, modelo 5500, utilizando cantilever NSC15-AIBS (*Mikromasch*®), com constante de força de 40 N m^{-1} e frequência de ressonância de ~ 320 KHz, no modo de contato intermitente (*tapping*). As imagens foram obtidas através do *software Picoview 14.4* e o pós-tratamento de dados foi realizado com o *software Gwyddion 2.52*. Para determinação de comprimento e altura foram utilizadas apenas as imagens de topografia.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Apenas as amostras de nanocristais NCC-01 (sulfatado) e NCC-PH (fosfatado) foram analisadas por MEV. O preparo de amostra para essa técnica foi o mesmo utilizado para a de MFA, exceto pelo fato do substrato ser diferente, as amostras foram analisadas sobre um substrato de cobre.

As imagens foram obtidas através do equipamento JEOL JSM, modelo 6360-LV, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná.

3.5.3 Difração de Raios-X em pó (DRX)

Os nanocristais sulfatados (NCC-01), parcialmente sulfatados (NCC-D2 e NCC-S1), fosfatados (NCC-PH), e a celulose microcristalina (MCC-101) tiveram suas estruturas cristalinas analisadas por difração de raios-X em pó, através do equipamento *Shimadzu® XRD 6000*, operando na voltagem de 40 kV e corrente de 20 mA com radiação Cu K α ($\lambda = 0,154$ nm). As amostras, foram posicionadas em *holder* de alumínio e os dados foram coletados em modo contínuo, em ângulos 2θ de 5 a 95° na velocidade de 2° min⁻¹.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS (AMP E XG)

Ambas as amostras, de XG e AMP, foram caracterizadas por cromatografia de exclusão de tamanho (*Size Exclusion Chromatography – SEC*) acoplado a multi-detectores, como índice de refração, índice viscosimétrico e espalhamento de luz em ângulos de 7° e 90° (*LALS* e *RALS*), ambos fabricados pela Viscotek®. Os polissacarídeos, AMP e XG, foram analisados em uma concentração de 1 mg mL⁻¹, conservados com 200 ppm de azida (NaN₃) e filtradas em membranas Millipore® de éster de celulose, com poros de diâmetro de 0,22 μ m. Em seguida, as amostras foram injetadas em um sistema cromatográfico acoplado a multi-detectores, composto por uma bomba de fluxo e coluna de polimetacrilato Shodex®-OH 806HQ.

Suspensões de 2 % e 10 % de XG e AMP, respectivamente, conservados com 50 ppm de NaN₃ foram utilizadas para a construção do diagrama de fases. Para

o mesmo, amostras de XG e AMP foram diluídas, em várias concentrações, agitadas em agitador do tipo Vórtex, durante 1 min. A separação entre as fases nos tubos foi monitorada e após completa separação, as mesmas foram individualmente coletadas, com auxílio de agulha e seringa, evitando-se a contaminação entre as mesmas, e quantificação dos polissacarídeos contidos em cada uma das fases, por SEC.

A caracterização dos polissacarídeos, AMP e XG, bem como o diagrama de fases, foram realizados por Hazt et al. (2020).

3.7 ANÁLISE DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS CRISTAIS SULFATADOS E FOSFATADOS SOBRE A ESTABILIDADE DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA EM XILOGLUCANA

Os nanocristais de celulose sulfatados (NCC-01, NCC-D2, NCC-S1 e NCC-NS), com teores de sulfato distintos, nas concentrações de 0,05 %; 0,10 %; 0,15 % e 0,20 % (m/m) e os nanocristais de celulose fosfatados (NCC-PH) nas concentrações de 0,005 %; 0,05%; 0,10 %; 0,15 % e 0,20 % (m/m), foram avaliados em emulsões de AMP e XG, nas concentrações de 1,020 % AMP e 1,300% XG. Em tais concentrações, segundo diagrama de fases, serão obtidas emulsões de AMP em XG.

Para o preparo das emulsões, foram utilizadas dispersões de AMP 10% (m/m) e XG a 2% (m/m) em água destilada, com 150 ppm de azida, como conservante, filtrada com membranas Millipore® de éster de celulose, com 0,22 µm de diâmetro de poros. Os nanocristais de celulose foram utilizados em uma suspensão de 1,0 % (m/m)

Primeiro, a dispersão de AMP foi pesada e a ela adicionada a dispersão de XG, a amostra foi agitada no *Vortex (Genie T2)*, por 30 s, em velocidade 8 (máxima). Na sequência, água foi adicionada seguida de 30 s em agitação nas mesmas condições anteriores. Por fim, a suspensão de nanocristais de celulose, previamente sonicada (60 s, 25% amplitude, *Sonics Vibra Cell®*) foi adicionada e agitada por 60 s, no *Vortex*. As amostras foram armazenadas em repouso, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. A estabilidade avaliada macroscopicamente com o tempo. As imagens foram registradas com uma câmera digital Nikon®, modelo COOLPIX L820.

3.8 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS EMULSÕES

As emulsões foram avaliadas, também, através da técnica de microscopia confocal a laser (MCL), utilizando um microscópio da marca Nikon®, modelo Ti, no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF), no setor de Ciências Biológicas da UFPR. Outro equipamento, da marca Leica®, modelo SP5 AOBS, também foi utilizado no Instituto Carlos Chagas (ICC) – Fiocruz. Os comprimentos de onda utilizados foram 488 nm e 663 nm e as objetivas com aumento de 20x, 40x e 60x com imersão em água. As imagens foram processadas com o software *ImageJ. Fiji*, versão 1.52p.

Foram avaliados, nas emulsões, nanocristais sulfatados nas concentrações de 0,05 %, 0,10 %, 0,15 % e 0,20 % (m/m) e fosfatados, nas concentrações de 0,005 %, 0,05 %, 0,10 % e 0,20 % (m/m) nos tempos de 0, 2 h e 24 h. Para isso, a AMP utilizada foi marcada com isotiocianato de fluoresceína (AMP-FITC) e 10 % desse material foi utilizado na massa de AMP total do sistema. Os nanocristais, em suspensões a 1,0% (m/m) foram marcados com 5 ppm de azul do Nilo, conforme reportado por Peddireddy et al. (2016). A presença dos fluoróforos não alterou a cinética do processo de separação de fases.

3.9 AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE DE AMOSTRAS DE XILOGLUCANA COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Foram obtidas curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, para amostras de XG em concentração de 1,30 % (m/v) e também com nanocristais de celulose sulfatados (NCC-01) nas concentrações de 0,20 % e 1,0 % (m/v) e nanocristal fosfatados (NCC-PH) na concentração de 1,0 % (m/v). Os experimentos foram realizados no reômetro *Thermo Scientific HAAKE Rheosress 1*, equipado com geometria de cone (60 mm diâmetro, ângulo de 2°). Foi realizada uma rampa ascendente de cisalhamento, de 0 a 100 s⁻¹, com duração de 300 s. A temperatura foi controlada e mantida em 25,0 ± 0,5 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foram isolados nanocristais de celulose a partir da hidrólise da celulose microcristalina com ácido sulfúrico (NCC-01 e NCC-NS) e com ácido fosfórico (NCC-PH). Posteriormente, a amostra (NCC-01) foi dessulfatada, dando origem a nanocristais com diferentes teores de sulfato (NCC-D2 e NCC-S1). A amostra NCC-NS, foi obtida nas mesmas condições da NCC-01, contudo nunca foi seca e sua suspensão foi armazenada em geladeira. Na sequência, são apresentados os resultados da quantificação dos teores de sulfato e fosfato, através de titulação condutométrica e análise morfológica, por microscopia de força atômica, microscopia de varredura e difração de raios-X. Em seguida, o comportamento desses nanocristais, em 4 concentrações, foi avaliado em emulsões de AMP em XG e os resultados, macro e microscópicos, serão apresentados.

4.1 ISOLAMENTO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Os resultados de rendimento obtidos a partir das hidrólises da celulose microcristalina com ácido sulfúrico e fosfórico estão dispostos na TABELA 1. Quando em suspensão, os nanocristais obtidos apresentam-se como um líquido cuja turbidez depende da concentração, ou seja, quanto mais concentrado mais turvo. Após secos, apresentam-se na forma de pó branco fino.

De acordo com Bondeson et al. (2006), o rendimento para uma hidrólise de celulose microcristalina, nas condições realizadas, é de aproximadamente 40 % e o valor obtido, de 36,2 % para NCC-01, está dentro do esperado. Os nanocristais NCC-NS tiveram sua concentração determinada por gravimetria, resultando em 45,1%, também dentro do esperado. O rendimento para hidrólise com ácido fosfórico (NCC-PH) foi de 19 %. Como reportado por Camarero-Espinosa et al. (2013) o rendimento foi de 80 %, muito superior ao desse trabalho. Isso pode ser atribuído ao fato de que os materiais de partida e a secagem do produto final são diferentes. Hao et al. (2015) também relataram valores menores de rendimento, para hidrólise com ácido fosfórico para celulose microcristalina, variando de acordo com as condições de temperatura e tempo de reação, chegando em valores de aproximadamente 30%, que é próximo do esperado.

A divergência entre os valores de rendimento da literatura pode ser explicada pela técnica de secagem dos cristais. Os rendimentos calculados na literatura levam em conta os nanocristais ainda em suspensão, através de análise gravimétrica. Os nanocristais NCC-01 e NCC-PH foram secos através de aspersão, por *Spray-Dryer*, isso pode fazer com que o rendimento diminua por perdas no processo de secagem. Já os nanocristais, que nunca foram secos (NCC-NS), apresentam rendimento muito próximo ao da literatura.

TABELA 1: RESUMO DOS DADOS DAS HIDRÓLISES DA CELULOSE MICROCRISTALINA PARA OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS (NCC-01 E NCC-NS) E FOSFATADOS (NCC-PH).

| Amostra | Ácido | Concentração | Tempo / h | Temperatura / °C | Rendimento |
|---------|--------------------------------|--------------|-----------|------------------|------------|
| NCC-01 | H ₂ SO ₄ | 64 % (m/m) | 2,5 | 45 | 36,2 % |
| NCC-NS | H ₂ SO ₄ | 64 % (m/m) | 2,5 | 45 | 45,1 % |
| NCC-PH | H ₃ PO ₄ | 85 % (m/v) | 1,5 | 58 | 19,2 % |

FONTE: O autor (2019).

A partir dos nanocristais NCC-01, foram obtidos mais dois tipos de cristais: NCC-D2 e NCC-S1, obtidos a partir de dessulfatações descritas na seção 3.3.

Os nanocristais NCC-D2 também foram secos por técnica de *Spray-Dryer*, obtendo-se um rendimento de 20,8 %. Esse valor pode ser explicado pelo processo de secagem, que acarretou muita perda do material.

Já os nanocristais NCC-S1, foram mantidos em suspensão para evitar perdas de secagem, a concentração foi determinada por gravimetria. Nesse caso, o rendimento da reação foi de 34,2 %.

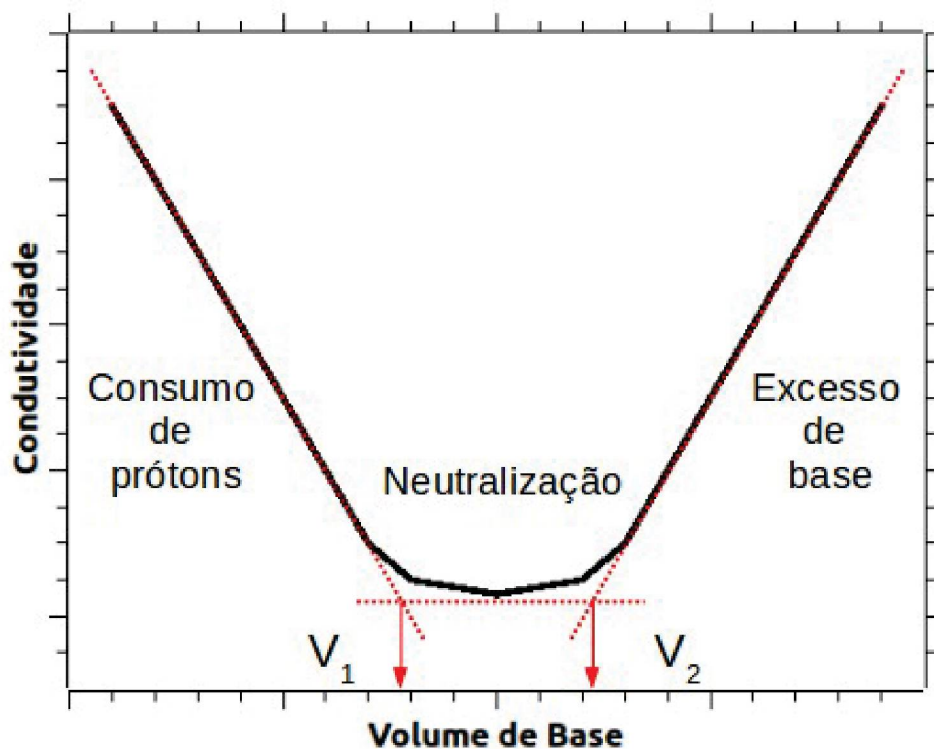
4.2 TEORES DE SULFATO E FOSFATO DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Uma das técnicas mais comuns para quantificação do teor de grupamentos sulfato e fosfato é a titulação condutométrica, que avalia a variação de condutividade em função da adição de uma solução álcali diluída, como ilustra a FIGURA 9. A técnica quantifica, indiretamente, o teor de grupos sulfato e fosfato através do consumo de hidrogênios ácidos (dos grupamentos R-OSO₃H e R-OPO₃H), neutralizados através de uma base.

É importante notar que os cristais devem estar em sua forma ácida, ou seja, todo sulfato da superfície deve estar protonado. Isso justifica o uso de uma resina de troca catiônica para o preparo de uma amostra para titulação (BECK et al. 2015).

A adição de uma base, comumente NaOH diluída, consome os hidrogênios ácidos dos grupamentos sulfato/fosfato, neutralizando-os. Essa neutralização faz com que a condutividade do meio diminua linearmente até o ponto de neutralização de todos os hidrogênios. Após a neutralização, há excesso de íons da base, o que aumenta linearmente a condutividade. Uma maneira simples de se obter o valor de base utilizado na neutralização é fazer um ajuste por regressão linear das regiões de consumo de prótons, neutralização e excesso de base, igualando-se as retas, obtém-se dois valores de volume de neutralização, sendo o primeiro (V_1) o utilizado para o cálculo de teor de sulfato e fosfato.

FIGURA 9: ESQUEMA DE TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA, AVALIANDO A VARIAÇÃO DA CONDUTIVIDADE FRENTE A ADIÇÃO DE UMA BASE.

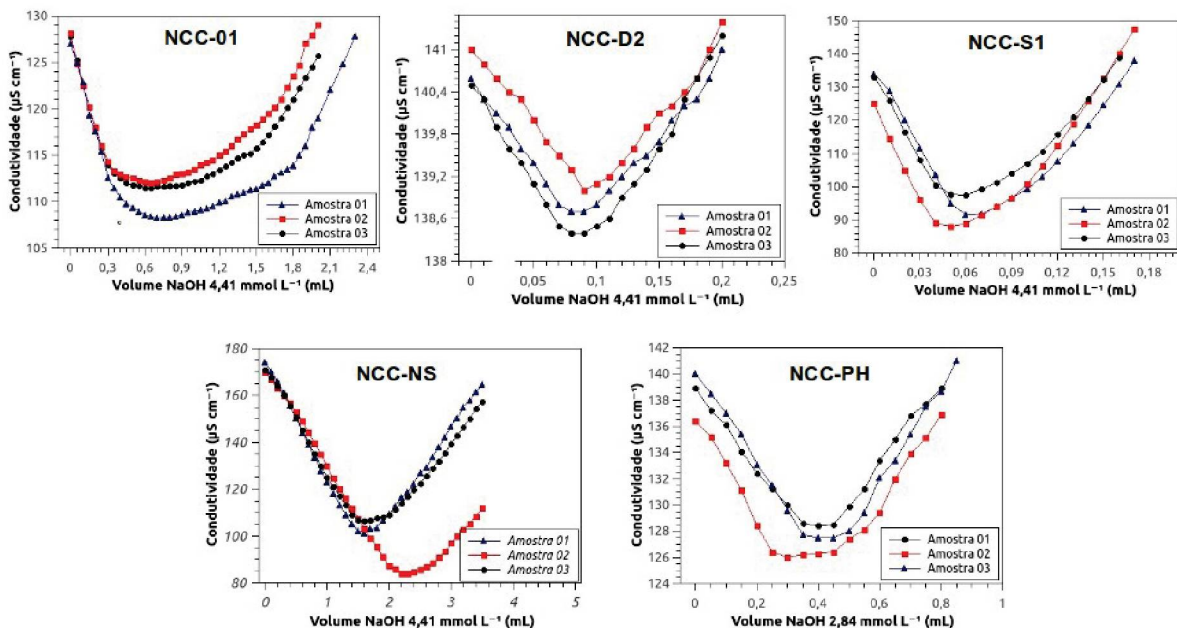


FONTE: O autor (2019).

4.2.1 Titulação das amostras de nanocristais de celulose

As amostras de nanocristais, tanto sulfatado quanto o fosfatado, foram tituladas de acordo com a metodologia descrita na seção 3.4. Os gráficos obtidos das titulações estão expostos na FIGURA 10.

FIGURA 10: GRÁFICOS DAS TITULAÇÕES CONDUTOMÉTRICAS PARA AS AMOSTRAS DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE, COM DIFERENTES TEORES DE SULFATO (NCC-01, D2, S1 E NS) E FOSFATADOS (NCC-PH).



FONTE: O autor (2019).

Para determinar o volume de NaOH necessário para neutralizar os nanocristais foram traçadas duas retas, uma na região decrescente e outra crescente, cuja interseção fornece o valor exato do volume. Os coeficientes das equações da reta estão dispostas na TABELA 2. Os valores do teor de sulfato diferem-se significativamente entre si, pelo teste unidirecional ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

O volume exato pode ser determinado a partir da equação 5, onde α é o coeficiente linear e β o angular:

$$\text{Condutividade}(\mu\text{S cm}^{-1}) = \alpha(\mu\text{S cm}^{-1}\text{ mL}^{-1}) \cdot V_{\text{NaOH}}(\text{mL}) + \beta(\mu\text{S cm}^{-1}) \quad (5)$$

Existe um único valor de volume, descrito pela equação 6, que atende a interseção das duas retas, sendo então:

$$V_{\text{NaOH}}(\text{mL}) = \frac{[\beta(c) - \beta(d)]}{[\alpha(d) - \alpha(c)]} \quad (6)$$

Sendo $\alpha(c)$ e $\beta(c)$ os coeficientes, angulares e lineares da reta crescente e $\alpha(d)$ e $\beta(d)$, da reta decrescente.

TABELA 2: RESUMO DOS DADOS DE MASSA E VOLUME DE BASE UTILIZADA, BEM COMO OS VALORES DE REGRESSÃO LINEAR PARA AS CURVAS DE TITULAÇÃO DOS CRISTAIS.

| Cristal | Amostra | Massa (mg) | Volume NaOH (mL) | Região decrescente (d) | | | Região crescente (c) | | |
|---------|---------|------------|------------------|------------------------|------------|--------|----------------------|------------|--------|
| | | | | $\alpha(d)$ | $\beta(d)$ | r^2 | $\alpha(c)$ | $\beta(c)$ | r^2 |
| NCC-01 | 01 | 20,76 | 0,44 | -48,36 | 127,23 | 0,9919 | 5,30 | 103,56 | 0,9917 |
| | 02 | 20,77 | 0,46 | -45,36 | 127,36 | 0,9914 | 11,33 | 101,43 | 0,9942 |
| | 03 | 20,70 | 0,43 | -46,14 | 127,41 | 0,9951 | 7,71 | 104,20 | 0,9925 |
| NCC-D2 | 01 | 6,68 | 0,08 | -25,00 | 140,60 | 0,9962 | 17,71 | 137,05 | 0,9874 |
| | 02 | 7,04 | 0,10 | -25,14 | 141,27 | 0,9937 | 22,99 | 136,65 | 0,9944 |
| | 03 | 7,29 | 0,10 | -28,69 | 140,52 | 0,9968 | 33,14 | 134,60 | 0,9909 |
| NCC-S1 | 01 | 12,03 | 0,07 | -800,9 | 135,54 | 0,9954 | 604,9 | 34,41 | 0,9978 |
| | 02 | 11,97 | 0,06 | -902,0 | 123,94 | 0,9945 | 635,9 | 34,52 | 0,9978 |
| | 03 | 12,26 | 0,06 | -830,0 | 133,40 | 0,9980 | 564,0 | 48,06 | 0,9976 |
| NCC-NS | 01 | 30,46 | 1,62 | -50,22 | 175,70 | 0,9985 | 37,53 | 33,51 | 0,9972 |
| | 02 | 32,37 | 1,76 | -42,92 | 172,52 | 0,9978 | 39,76 | 26,86 | 0,9965 |
| | 03 | 29,80 | 1,65 | -47,00 | 172,96 | 0,9972 | 32,69 | 41,65 | 0,9959 |
| NCC-PH | 01 | 19,80 | 0,40 | -30,29 | 138,81 | 0,9946 | 31,00 | 114,55 | 0,9916 |
| | 02 | 20,30 | 0,36 | -44,80 | 137,58 | 0,9973 | 36,00 | 108,27 | 0,9900 |
| | 03 | 20,50 | 0,43 | -35,07 | 140,28 | 0,9943 | 36,86 | 109,54 | 0,9938 |

FONTE: O autor (2019).

Com os volumes estabelecidos, os teores e percentuais de sulfato e fosfato podem ser calculados, levando em consideração a massa de nanocristais e concentração da base, através das equações 3 e 4. As amostras NCC-01, D2, S1 e NS foram tituladas com NaOH, padronizado de 4,41 mmol L⁻¹. Já os fosfatados, foram titulados com outra solução padronizada de 2,84 mmol L⁻¹.

A média dos valores do teor de sulfato e fosfato para essas amostras de nanocristais estão dispostas na TABELA 3.

TABELA 3: RESUMO DOS RESULTADOS DO TEOR DE SULFATO E FOSFATO, OBTIDOS POR TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA PARA NANOCRISTAIS DE CELULOSE.

| Nanocristal | Teor SO ₄ / mmol kg ⁻¹ | % S | Teor PO ₄ / mmol kg ⁻¹ | % P |
|-------------|----------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------|-------------|
| NCC-01 | 94,2 ± 2,7* | 0,30 ± 0,01* | - | - |
| NCC-D2 | 57,6 ± 2,6* | 0,18 ± 0,01* | - | - |
| NCC-S1 | 23,3 ± 2,7* | 0,07 ± 0,01* | - | - |
| NCC-NS | 239,5 ± 4,6 | 0,77 ± 0,01 | - | - |
| NCC-PH | - | - | 55,6 ± 4,3 | 0,17 ± 0,01 |

* ANOVA, seguida de teste post-hoc de Tukey com $p < 0,01$.

FONTE: O autor (2019).

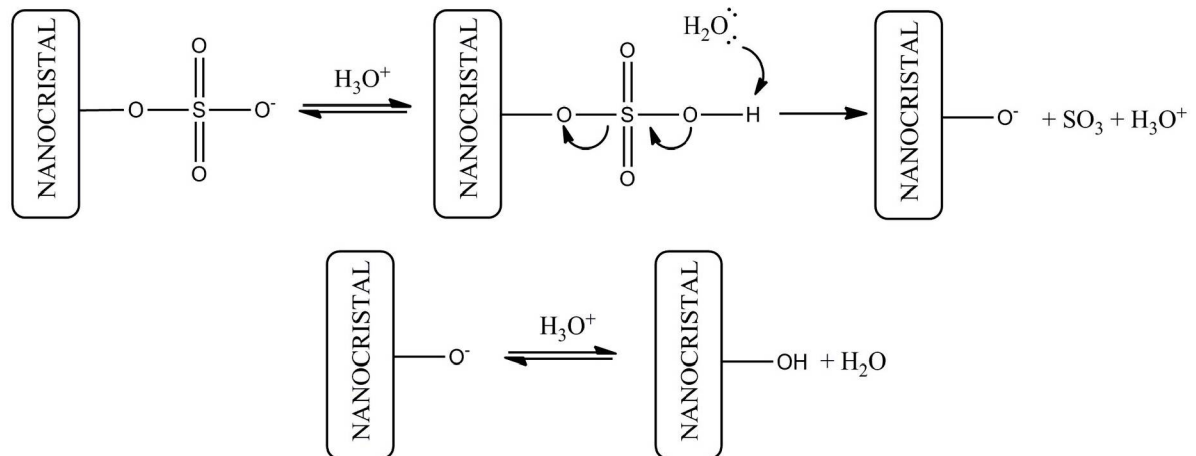
Os valores obtidos estão de acordo com a literatura. Segundo Foster et al. (2018), para nanocristais sulfatados os valores variam entre 80 a 350 mmol kg⁻¹ e 10 – 30 mmol kg⁻¹ para os fosfatados.

O valor para o nanocristal NCC-NS é muito maior que o valor obtido para os nanocristais NCC-01. Embora tenham sido isolados nas mesmas condições, o valor pode ser distinto pela etapa de secagem do material. Duas hipóteses são plausíveis: uma delas é de que a alta temperatura da secagem pode ter dessulfatado parcialmente os cristais NCC-01, ou o valor pode ter diminuído devido a agregação de vários cristais durante a secagem, o que reduziria o número de grupamentos sulfatos expostos na superfície.

Do valor inicial de 94,2 ± 2,7 mmol kg⁻¹, para os nanocristais NCC-01, houve uma redução de ~ 39 % no teor de sulfato, chegando no valor de 57,6 ± 2,6 mmol kg⁻¹. De acordo com Jiang et al. (2010), cada ciclo de dessulfatação reduz o teor de sulfato para um valor de cerca de 20 a 30 % do inicial, isso corrobora com o valor obtido para os nanocristais sulfatados, que passaram por dois ciclos de

dessulfatação. O mecanismo da reação, catalisada por ácido, é mostrado na FIGURA 11.

FIGURA 11: MECANISMO DA REAÇÃO DE DESSULFATAÇÃO CATALISADA POR ÁCIDO.



FONTE: O autor (2019).

A solvólise ainda não tem um mecanismo de reação bem estabelecido, embora seja utilizada na literatura (JIANG et al., 2010; NAGASAWA, et al., 1974; NAGASAWA et al., 1977). Em todo caso, o valor obtido para NCC-S1, de $23,3 \pm 2,7$ mmol kg⁻¹, indica que houve redução de ~ 75 % do valor inicial de $94,2 \pm 2,7$ mmol kg⁻¹. Embora a dessulfatação não seja completa, a diferença do teor de sulfato é suficiente para estabelecer um estudo comparativo.

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE

A morfologia dos nanocristais de celulose usualmente é reportada na literatura como estruturas nanométricas em forma de bastão com uma razão de aspecto (razão largura/altura) variando na faixa de 15 a 200. Contudo, outras morfologias já foram relatadas, conforme ilustra a TABELA 4. É possível notar que a condição de hidrólise e o material de partida são decisivos no resultado final dos nanocristais. Utilizando um mesmo material de partida, como a celulose microcristalina, é possível obter resultados completamente diferentes, variando-se as condições reacionais. Por exemplo, se a hidrólise ocorre em um meio de ácido

fosfórico é possível obter nanocristais em formato esférico (HAO et al., 2015), em contrapartida, utilizando ácido sulfúrico são obtidos nanocristais em formato de bastão (BONDESON et al., 2006). O mecanismo associado a tais diferenças ainda estão sob investigação e não foram determinados em literatura.

Caso as condições de hidrólise (ácido, concentração, massa da amostra, volume reacional, tempo e temperatura de reação) sejam as mesmas para dois materiais de partida diferentes, também são obtidos resultados distintos. Por exemplo, utilizando ácido fosfórico, se o material de partida for papel-filtro, serão obtidos nanocristais fosfatados em forma de bastão (CAMARERO-ESPINOSA et al., 2013), caso seja utilizado celulose microcristalina, obter-se-ão nanocristais com formato de esfera ou disco (HAO et al., 2015; TORLOPOV et al., 2018).

TABELA 4: RESUMO DE DADOS DA LITERATURA PARA OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE DE DIFERENTES MATERIAIS DE PARTIDA, MORFOLOGIA, DIMENSÕES, RENDIMENTO E CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE.

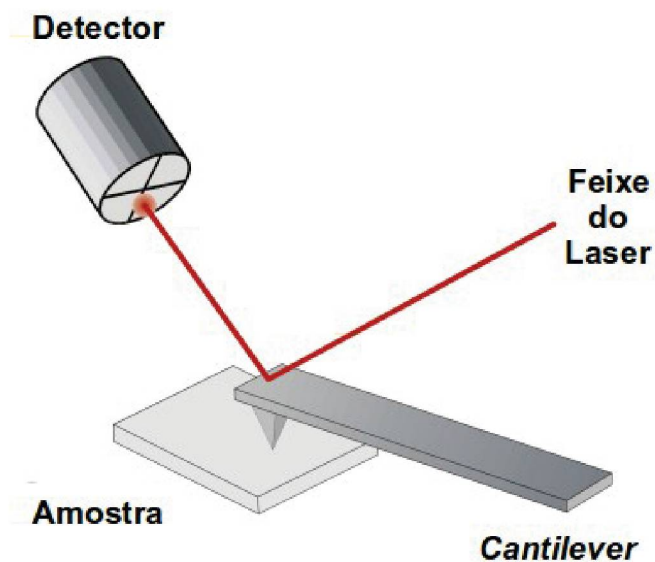
| Condições da Hidrólise | Material de Partida | Morfologia Nanocristais | Dimensões | Rendimento | Referência |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| H ₂ SO ₄ 64% (m/m), 130 min, 44 °C | Celulose Microcristalina | Bastões | Entre 200 e 400 nm de comprimento e menos de 10 nm de altura | ~ 40 % | Bondeson et al., 2006 |
| H ₃ PO ₄ , 85 % (v/v), vários tempos e temperaturas | Papel-filtro | Bastões | ~ 300 nm de comprimento e ~30 de altura | ~ 80 % | Camarero Espinosa et al., 2013 |
| H ₃ PO ₄ , 85 % (v/v), vários tempos e temperaturas | Celulose Microcristalina | Esferas | Variam de acordo com as condições da hidrólise, de 500 nm até 1 µm) | ~30 a 80 %, dependendo das condições de hidrólise | Hao et al., 2015 |
| NaOH 9 % (m/m)/ Tiourea 7 % (m/m), - 4 °C | Celulose Microcristalina | Discos | Diâmetro de ~ 70nm e 60 nm de altura | ~50 % | Torlopov et al., 2018 |

FONTE: O autor (2019).

4.3.1 Análise por microscopia de força atômica (MFA)

Técnicas microscópicas por sonda de varredura (do inglês *Scanning Probe Microscopy – SPM*) são muito utilizadas para análises morfológicas de cristais, conforme reporta Kvien et al. (2005); Lahiji et al. (2008). A MFA é uma ferramenta que possibilita a caracterização de materiais em uma escala nanométrica. Nesse tipo de análise, um feixe de laser é direcionado sobre um dispositivo, chamado *cantilever*, que possui uma ponta (com menos de 10 nm de diâmetro), como mostra a FIGURA 12.

FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FUNCIONAMENTO DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.

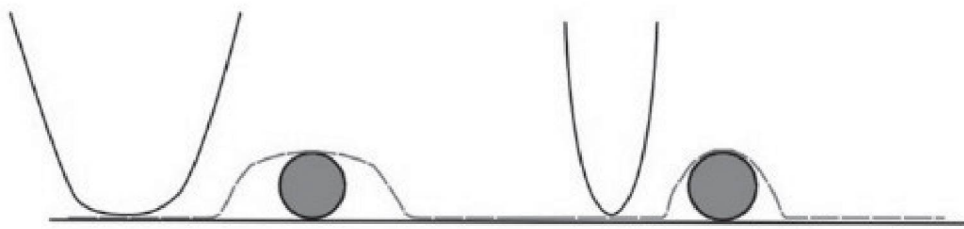


FONTE: Adaptado de ETH Zurich - Laboratory for Multifunctional Ferroic Materials (2019). Disponível em: <https://ferroic.mat.ethz.ch/research/methods/atomic-force-microscope.html>. Acesso em: 01 out. 2019.

O laser é refletido para um detector que mede a deflexão do *cantilever* enquanto o mesmo varre a amostra. Com isso, é possível obter imagens de topografia da amostra, com uma resolução nanométrica. Além disso, o equipamento pode operar nos modos: 1 – Contato, onde a ponta “encosta” na amostra para fazer a varredura; 2 – Contato intermitente, onde o *cantilever* oscila em determinada frequência e a ponta encosta eventualmente na amostra e 3 – Não-Contato, onde o *cantilever* oscila e não “encosta” na amostra. A técnica de MFA apresenta uma

limitação quando se medem amostras cuja largura é menor ou de um tamanho próximo ao da ponta. Nesse caso, as imagens aparecem muito mais largas do que realmente são. Esse fenômeno é chamado de convolução. Contudo, uma maneira alternativa de se obter o valor do diâmetro e/ou largura é através da altura. A convolução e a medida da altura são ilustrados na FIGURA 13 (EATON & WEST, 2010).

FIGURA 13: ILUSTRAÇÃO DO EFEITO DE CONVOLUÇÃO. A PONTA DO *CANTILEVER* É MAIOR QUE A LARGURA DA AMOSTRA (CINZA), A IMAGEM OBTIDA (LINHA PONTILHADA) É MAIS LARGA QUE O ESPERADO. PONTAS MAIS FINAS DIMINUEM ESSE EFEITO, COMO NO DESENHO DA DIREITA.



FONTE: Adaptado de Eaton & West (2010).

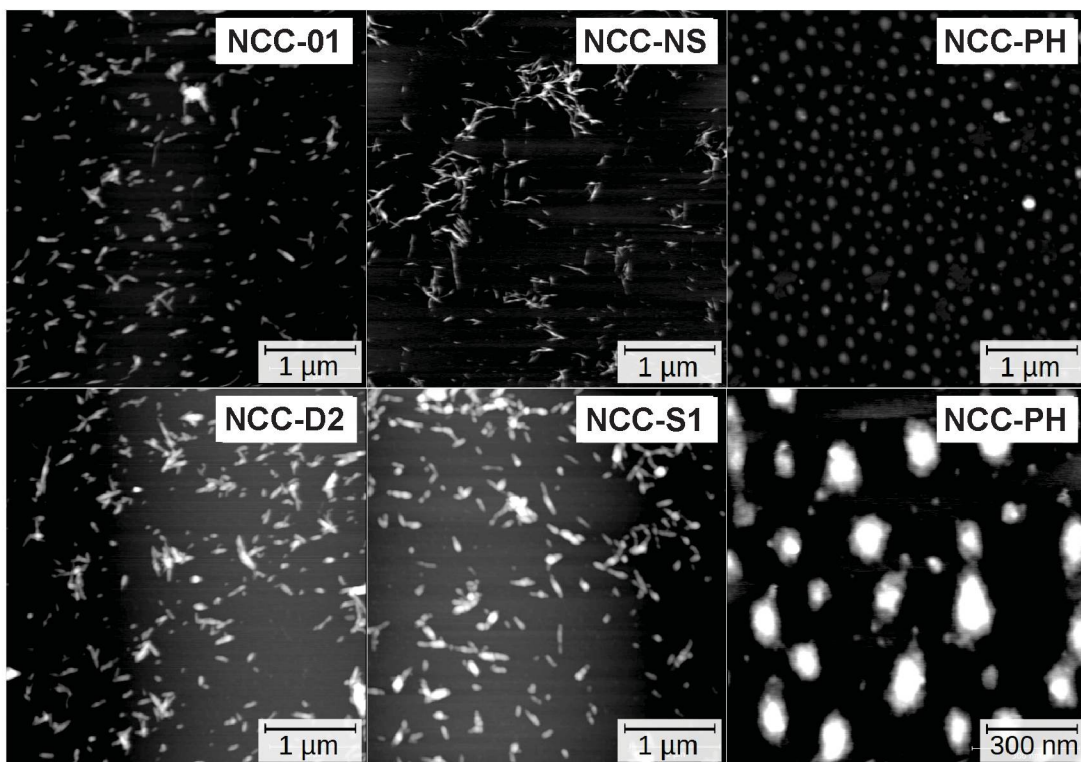
As imagens de topografia obtidas para os nanocristais de celulose sulfatados (NCC-01, D2, S1, NS e PH) encontram-se na FIGURA 14.

É possível observar que os nanocristais sulfatados são semelhantes entre si, diferenciando-se apenas pela quantidade de aglomerados. Na imagem referente à amostra NCC-01, os cristais estão dispersos, o mesmo não ocorre para os nanocristais NCC-D2 e NCC-S1, onde é visível uma maior quantidade de cristais acumulados. Isso pode ser explicado através da carga superficial de cada amostra. A amostra NCC-NS também apresenta alguns aglomerados, o que pode estar associado a maneira de armazenamento desses cristais, embora tenha um maior teor de sulfato, o fato de estar armazenada em suspensão pode fazer com que os cristais se aglomerem com o tempo. Os grupamentos sulfatos, ligados à superfície, conferem estabilidade coloidal aos nanocristais em suspensão, através da repulsão eletrostática (BECK et al., 2015).

É possível notar que existe uma grande diferença com relação à morfologia dos nanocristais fosfatados NCC-PH. Os mesmos se apresentam em forma de

discos. Morfologias como essas já foram reportadas na literatura (HAO et al., 2015; TORLOPOV et al., 2018; XU e CHEN, 2019). Contudo, o mecanismo que forma esses cristais ainda não é bem definido. Essa mudança pode estar relacionada aos polimorfos da celulose. Segundo Torlopov et al. (2018), uma transição entre polimorfo I e II, além de acarretar mudanças físico-químicas, pode levar a alterações morfológicas.

FIGURA 14: IMAGENS DE TOPOGRAFIA OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA, EM MODO DE CONTATO INTERMITENTE, DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS E FOSFATADOS DEPOSITADOS EM SUPERFÍCIE DE MICA, NUMA CONCENTRAÇÃO DE 0,020 % (M/M).

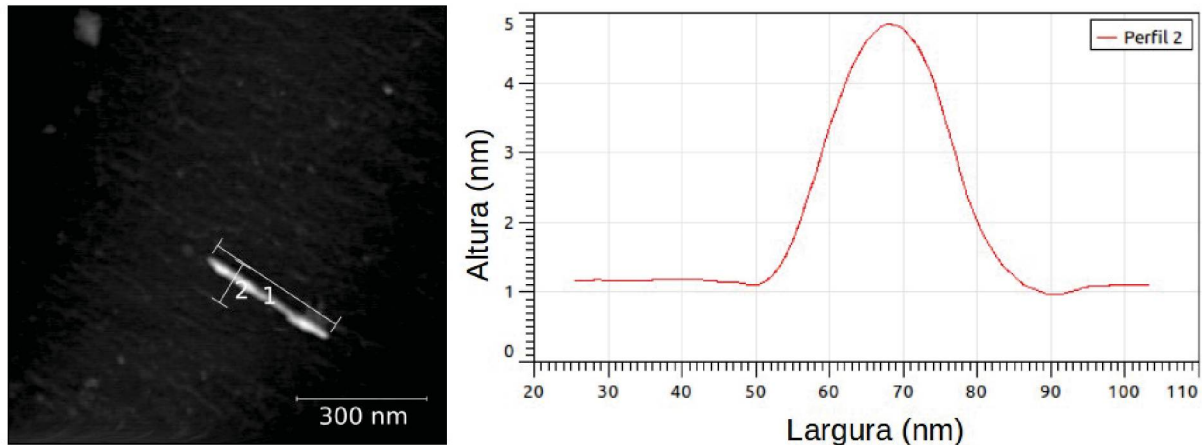


FONTE: O autor (2019).

Para a análise das dimensões, foram utilizadas imagens de topografia, o comprimento foi obtido normalmente e a altura foi medida através de um corte na imagem obtida do cristal, extraíndo o perfil, como ilustra a FIGURA 15.

Os valores de comprimento, altura, razão de aspecto (comprimento/altura) dos nanocristais, para um $n = 110$ nanocristais, está disposto na TABELA 5.

FIGURA 15: IMAGEM DE TOPOGRAFIA (ESQUERDA) PARA UM NANOCRISTAL DE CELULOSE SULFATADOS (NCC-01) E O PERFIL EXTRAÍDO PARA OBTEN O VALOR DA ALTURA DO CRISTAL.



FONTE: O autor (2019).

TABELA 5: RESUMO DAS DIMENSÕES E MORFOLOGIA DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS (NCC-01, D2 E S1) E FOSFATADOS (NCC-PH), PARA UMA AMOSTRAGEM DE N = 110 NANOCRISTAIS.

| | NCC-01 | NCC-D2 | NCC-S1 | NCC-NS | NCC-PH |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Morfologia | Bastões | Bastões | Bastões | Bastões | Discos |
| Comprimento / nm | 152 ± 24 | 156 ± 25 | 158 ± 25 | 165 ± 35 | 105 ± 1 |
| Altura / nm | 5 ± 1 | 5 ± 1 | 5 ± 2 | 6 ± 2 | 1,6 ± 0,5 |
| Razão de aspecto* | 29 | 29 | 32 | 28 | 68 |

* Razão de aspecto: razão entre o comprimento e altura.

FONTE: O autor (2019).

Os valores dos nanocristais NCC-01, NCC-D2 e NCC-S1 são muito próximos. Como era esperado, uma vez que os dois últimos (D2 e S1) são oriundos de dessulfatações do NCC-01. Isso mostra que não houve alteração na morfologia desses cristais após as reações, como sugere Jiang et al. (2010). E isso era um objetivo das dessulfatações, obter cristais com mesmo tamanho, diferenciando-se apenas em sua carga superficial, para fins comparativos. A razão de aspecto reportada por Bondeson et al. (2006) é de aproximadamente 30, assim como encontrada nesse trabalho. Os nanocristais NCC-NS diferem-se ligeiramente dos demais sulfatados, isso pode ser justificado pelo fato de que, mesmo em condições de hidrólise semelhante aos demais, podem existir pequenas variações nas

condições das hidrólises (como tempo, temperatura, centrifugação etc), que podem gerar pequenas divergências no tamanho dos cristais.

Já os nanocristais fosfatados, apresentaram uma morfologia distinta, em forma de discos. Como discutido anteriormente, na Tabela 4 da seção 4.3, as condições da hidrólise influenciam na morfologia final dos nanocristais de celulose e isso também depende do material de partida. Considerando que as camadas de celulose distam em 0,52 nm (BAKER et al., 1997), os nanocristais isolados nesse caso apresentam de 2 a 4 camadas moleculares de glucose, o que torna a razão de aspecto muito maior que a dos demais cristais, fator esse que deve ser levado em consideração para a estabilidade de emulsões (LOU et al., 2016; MADIVALA et al., 2009).

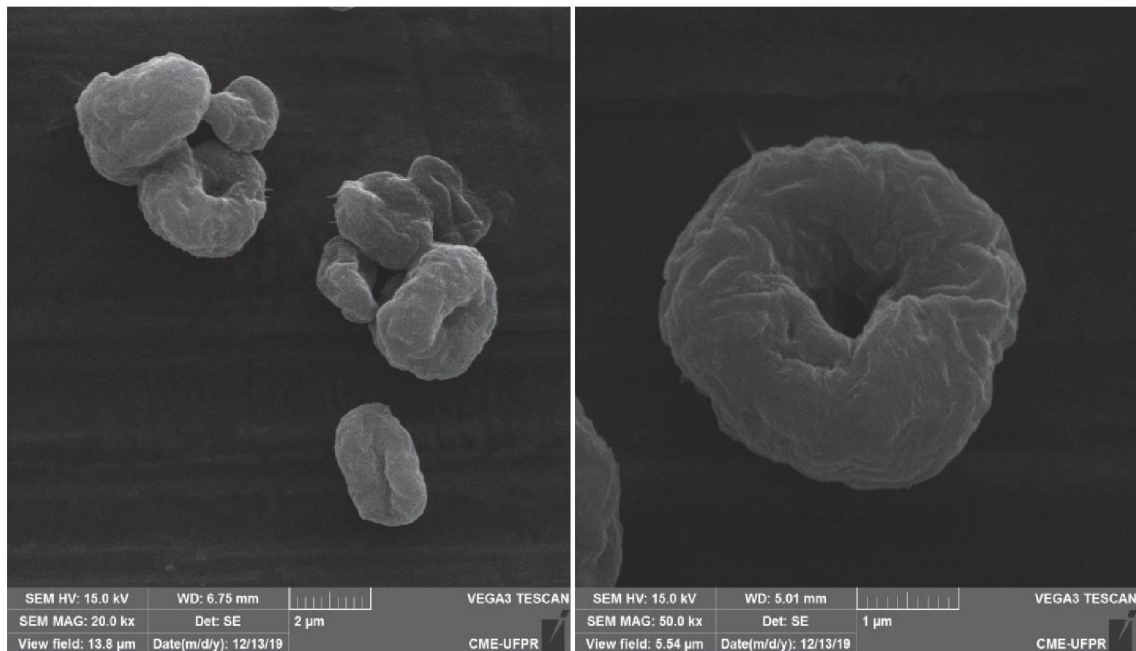
Camarero-Espinosa et al. (2013) utilizaram várias concentrações de ácido fosfórico, em vários tempos de hidrólise, utilizando papel-filtro de material de partida, obtendo nanocristais de celulose termicamente estáveis. Hao et al. (2015) também utilizaram ácido fosfórico em várias temperaturas e tempos de hidrólise. Contudo, seu material de partida era celulose microcristalina e o resultado final foram estruturas esféricas. O autor associa esse fenômeno a dissolução e regeneração da celulose. Outra morfologia, de nanocristais em formas de discos/pratos, também foi reportada por Torlopov et al. (2018), utilizando celulose microcristalina como material de partida, porém com a hidrólise conduzida com NaOH/tiourea. Com base nos trabalhos citados, fica evidente a possibilidade de obtenção de nanocristais de celulose com morfologias distintas a partir do mesmo material de partida. Portanto, a técnica de microscopia de varredura foi utilizada para explorar a morfologia, além da MFA, tanto de nanocristais sulfatados (NCC-01) quanto os fosfatados (NCC-PH).

4.3.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os nanocristais sulfatados, NCC-01, e os fosfatados, NCC-PH, foram analisados por outra técnica de microscopia – MEV – uma vez que apresentaram diferenças morfológicas através da análise com MFA.

As imagens para os nanocristais NCC-01 estão dispostas na FIGURA 16. É possível notar a formação de estruturas, em escala micrométrica, auto-organizadas.

FIGURA 16: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS NCC-01.



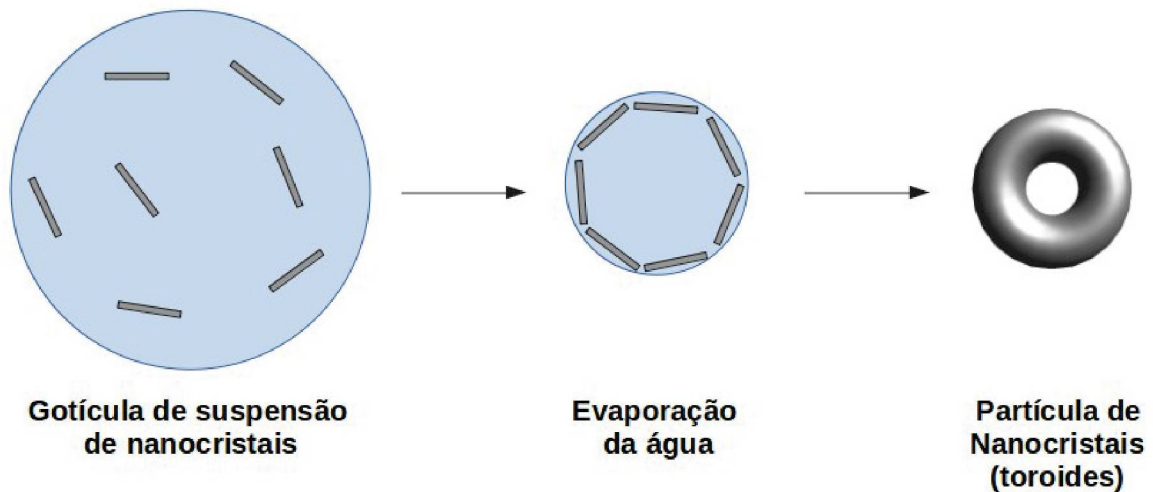
FONTE: O autor (2019).

Esse tipo de morfologia foi reportado recentemente na literatura por Esparza et al. (2019a, b). A explicação para formação dessas estruturas está relacionada à forma de secagem das suspensões de nanocristais de celulose. Em determinadas concentrações das suspensões e parâmetros da secagem por aspersão, no *Spray Dryer*, é possível obter estruturas em formas de toroides. A FIGURA 17 ilustra o possível mecanismo de formação dessas partículas.

Durante o processo de secagem, há um acúmulo de nanocristais de celulose na interface água/ar, isso forma uma espécie de casca que após a difusão e evaporação da água de seu interior, pode levar a formação de estruturas como na FIGURA 16.

A suspensão de nanocristais de celulose, NCC-01, foi seca em uma vazão de $0,40 \text{ L h}^{-1}$, com temperatura de entrada de $175 \text{ }^\circ\text{C}$ e saída a $110 \text{ }^\circ\text{C}$. Essas condições de temperatura são semelhantes as utilizadas por Esparza et al. (2019a), onde a temperatura de entrada era de $220 \text{ }^\circ\text{C}$ e $90 \text{ }^\circ\text{C}$ de saída. A vazão utilizada foi de $0,20 \text{ L h}^{-1}$. Em todo caso os resultados obtidos foram semelhantes.

FIGURA 17: POSSÍVEL MECANISMO DE FORMAÇÃO DE TOROIDES A PARTIR DA SECAGEM DE SUSPENSÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE POR *SPRAY DRYER*.



FONTE: Adaptado de Esparza et al. (2019).

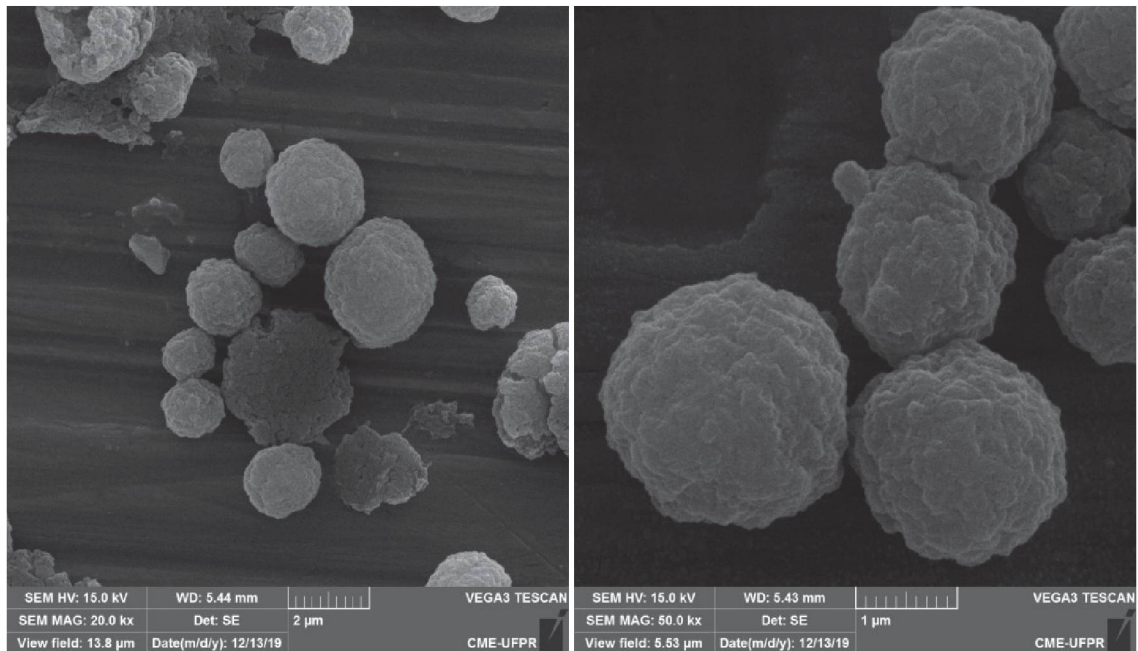
As amostras de nanocristais fosfatados, NCC-PH, também foram analisadas por MEV, o resultado é exposto na FIGURA 18. É possível notar que existem partículas esféricas, tão grandes quanto os toroides encontrados para os nanocristais NCC-01, em escala micrométrica. O resultado é compatível com os apresentados por Hao et al. (2015).

Esses cristais fosfatados também foram secos pela técnica de aspersão, assim como os sulfatados NCC-01, mas não foram encontrados toroides nesse caso. Uma possível explicação é pelo fato de que a concentração da suspensão, antes de ser seca, era menor, além de possíveis diferenças estruturais, como alomorfos distintos da celulose.

A técnica de MFA, utilizada anteriormente, é capaz de elucidar estruturas em escala nanométrica. O equipamento utilizado, *Agilent 5500*, possui um *scanner* que possibilita um campo de $8 \times 8 \mu\text{m}$, com altura de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ de resolução para obtenção das imagens. Na prática, estruturas maiores que essas dimensões não podem ser analisadas por esse equipamento, essa limitação é ilustrada na FIGURA 19.

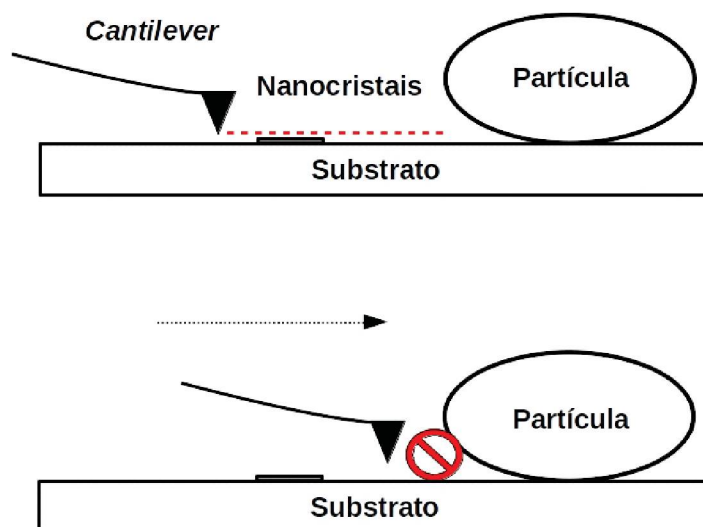
Ambas as técnicas de microscopia são úteis na elucidação da morfologia dos nanocristais, a MFA elucidou cristais em escala nanométrica enquanto a MEV elucidou as partículas maiores.

FIGURA 18: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE FOSFATADOS NCC-PH.



FONTE: O autor (2019).

FIGURA 19: LIMITAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) PARA PARTÍCULAS MUITO GRANDES (ORDEM DE MICRÔMETROS). O CANTILEVER É INCAPAZ DE INTERAGIR COM PARTÍCULAS MUITO ALTAS, INTERAGINDO APENAS COM ESTRUTURAS PEQUENAS, COMO NANOCRISTAIS DE CELULOSE.



FONTE: O autor (2020).

No caso da amostra NCC-01 e, conseqüentemente, as amostras NCC-D2 e S1, são misturas de nanocristais em forma de bastão junto de toroides da ordem de micrômetros. Já os nanocristais NCC-PH, apresentam esferas da ordem de micrômetros até nanoporos. E por fim, a amostra NCC-NS apresenta somente nanocristais em forma de bastão, por não passar por nenhum processo de secagem adicional.

4.3.3 Difração de Raios-X (DR-X) dos nanocristais em pó

A celulose pode se rearranjar de maneiras diferentes, de acordo com suas ligações intramoleculares, o que dá origem a formas distintas, que são chamadas de polimorfos, sendo classificados em celulose tipo I, II, III, IV e suas variedades, como $I\alpha$ e $I\beta$, por exemplo. Esses tipos de arranjo cristalinos podem se converter, reversível ou irreversivelmente (KOVALENKO, 2010). A técnica de difração de raios-X auxilia a identificar essas estruturas.

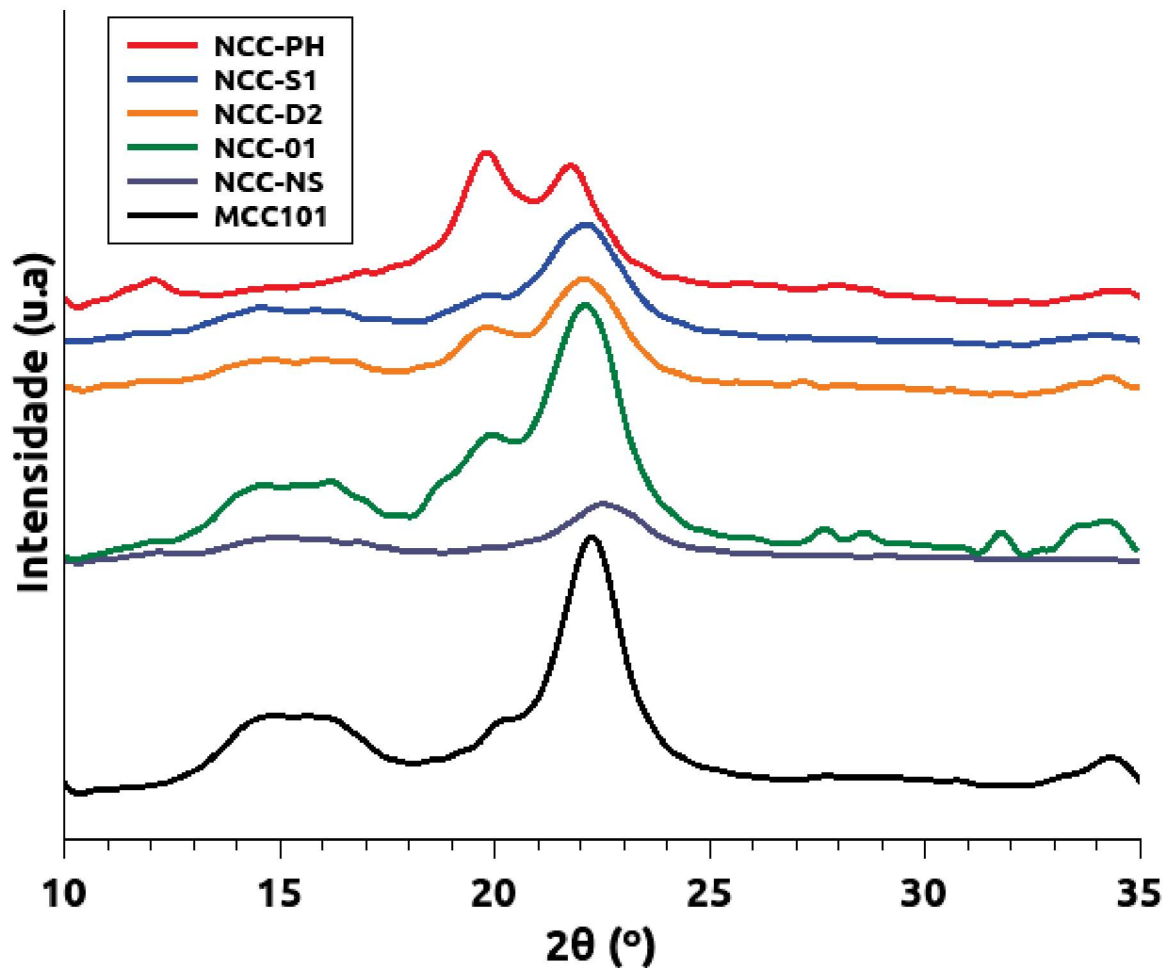
Nos difratogramas expostos na FIGURA 20, são apresentados os resultados da análise de DRX para o material de partida, celulose microcristalina (MCC101), os produtos de sua hidrólise com ácido sulfúrico (NCC-NS e NCC-01) e suas dessulfatações (NCC-D2 e NCC-S1), além do nanocristal obtido a partir da hidrólise com ácido fosfórico (NCC-PH).

Os picos do difratograma mostram os índices de Miller que estão relacionados com a estrutura cristalina. De acordo com French (2014), para a celulose tipo I, existem três picos característicos em $2\theta = 23^\circ$, 16° e $14,5^\circ$ referentes aos índices (200) , (110) e $(1\bar{1}0)$. Além disso, em cristais orientados aleatoriamente, surge um pico, muito sutil, próximo a 20° . Já para a celulose do tipo II em $2\theta = 22^\circ$, 20° e 12° são encontrados picos referentes aos índices (020) , (110) e $(1\bar{1}0)$.

Para a celulose microcristalina, MCC101, existem três picos característicos em $2\theta = 14,6^\circ$, $16,1^\circ$ e 22° que correspondem aos índices de Miller $(1\bar{1}0)$, (110) e (200) , respectivamente. Isso indica que a estrutura cristalina é do tipo I. As demais amostras sulfatadas NCC-NS, NCC-01, D2, e S1 também apresentam os mesmos picos característicos. É possível notar também, que em $2\theta \sim 20^\circ$ existem um pico menor, que indica cristais ordenados aleatoriamente. Como não houve

alteração do alomorfo de celulose, é possível notar que o processo de hidrólise, com ácido sulfúrico, não alterou a estrutura cristalina, sendo mantida sempre em tipo I.

FIGURA 20: DIFRATOGRAMA DAS AMOSTRAS DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SULFATADOS (NCC-NS, NCC-01, D2 E S1) E FOSFATADOS (NCC-PH) A PARTIR DA CELULOSE MICROCRISTALINA (MCC101).



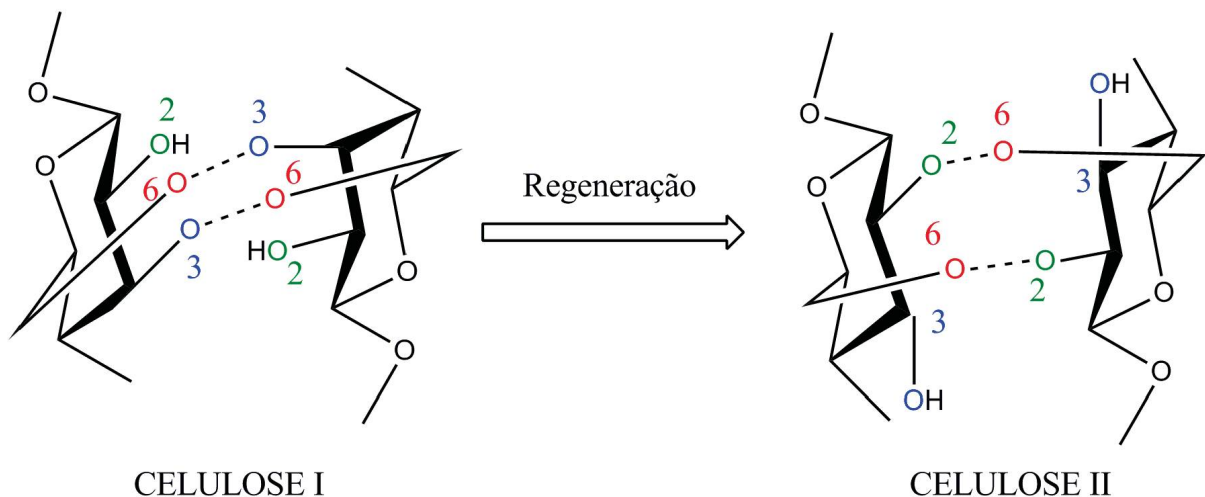
FONTE: O autor (2019).

Os cristais de celulose submetidos à hidrólise com ácido fosfórico, NCC-PH, apresentam picos em $2\theta = 12^\circ$, 20° e $21,8^\circ$, relacionados, respectivamente, aos índices $(1\bar{1}0)$, (110) e (020) , o que indica uma estrutura de celulose do tipo II.

A celulose do tipo I (nativa) pode ser convertida para o tipo II (recristalizada), através de um processo de regeneração (ZUBER et al., 2012). A diferença entre esses dois tipos é ilustrado na FIGURA 21, onde apenas é representado a estrutura inicial e final, sem detalhes do processo de regeneração.

O processo de dissolução e regeneração da celulose é amplamente estudado, como reporta Wang et al. (2016). A celulose pode ser solubilizada em vários tipos de solventes, como líquidos iônicos, soluções de NaOH, NaOH/tiourea, por exemplo. Em seguida, a celulose é regenerada (precipitada). Esse processo possibilita uma grande versatilidade para a celulose, que pode ser regenerada e formar materiais distintos com diversas morfologias, como filmes, membranas, bioplásticos, nanoesferas etc.

FIGURA 21: CONVERSÃO ENTRE CELULOSE TIPO I PARA TIPO II. AS LIGAÇÕES ENTRE OXIGÊNIO 6 E 3, NO TIPO I, SÃO CONVERTIDAS PARA LIGAÇÕES ENTRE 2 E 6, NO TIPO II.



FONTE: Adaptado de Zuber et al. (2012).

HAO et al. (2015) demonstraram que a celulose microcristalina, quando dispersa em uma solução de ácido fosfórico 85 %, em diversas temperaturas e tempos de reação, é dissolvida e regenerada em nanoestruturas esféricas, além de passar da estrutura de celulose tipo I para tipo II. Ademais, os autores não encontraram estruturas em forma de disco utilizando MEV e Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS – AMILOPECTINA (AMP) E XILOGLUCANA (XG)

Os parâmetros de Massa Molar Média em Massa (M_w) e Massa Molar Média em Número (M_n) Raio Hidrodinâmico (R_H), Viscosidade Intrínseca ($[\eta]$) e Dispersão

(\bar{D}), bem como o diagrama de fases foram analisados por Hazt et al. (2020) e os resultados estão resumidos na TABELA 6.

TABELA 6: DADOS, OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO, PARA OS POLISSACARÍDEOS: XILOGLUCANA E AMILOPECTINA.

| Parâmetro | XG | AMP |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| $M_w / \text{g mol}^{-1}$ | $8,3 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^6$ |
| $M_n / \text{g mol}^{-1}$ | $3,4 \times 10^4$ | $5,4 \times 10^5$ |
| $\bar{D} (M_w / M_n)$ | 2,4 | 1,9 |
| $[\eta] / \text{dL g}^{-1}$ | 2,5 | 3,8 |
| R_H / nm | 13,5 | 85,4 |

FONTE: Hazt et al. (2020).

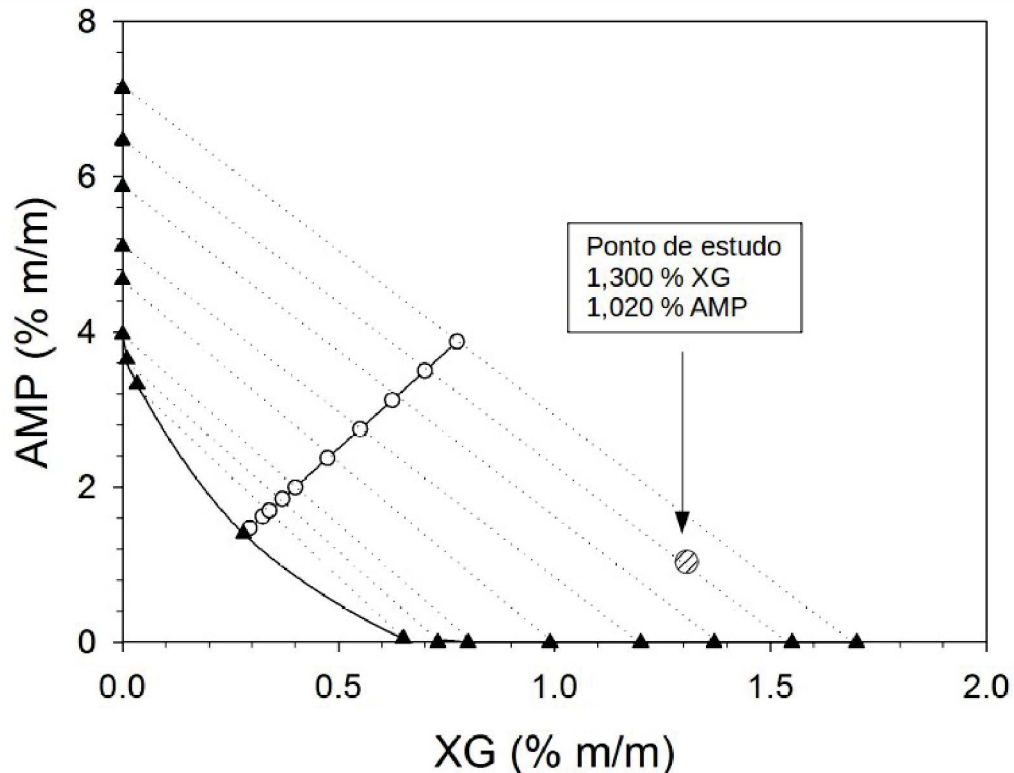
4.5 DIAGRAMA DE FASES

A partir das densidades das dispersões de AMP ($0,994 \pm 0,005 \text{ g mL}^{-1}$) e XG ($0,976 \pm 0,005 \text{ g mL}^{-1}$), foi concluído que a fase de XG é a superior e a AMP, inferior. Para a construção do diagrama, foram coletadas amostras de cada fase, em condição de equilíbrio, e analisadas por cromatografia de exclusão de tamanho. Na FIGURA 22 é possível observar o diagrama de fases para esse sistema.

Os triângulos fechados representam a linha binodal, que é o limite entre a formação de fases do sistema. Abaixo dessa linha, há formação de apenas uma fase e acima dela há formação de duas fases. A linha pontilhada é chamada de “linha de amarração” e representa a composição de cada fase em equilíbrio, qualquer ponto que esteja sobre essa linha fornece fases que apresentam propriedades termodinâmicas intensivas iguais (volume molar, densidade, viscosidade, tensão superficial etc), contudo, com propriedades extensivas distintas (fração volumétrica, massa etc). Os círculos abertos representam o valor onde os volumes de ambas as fases são iguais, acima dessa linha as emulsões são do tipo XG em AMP e abaixo, AMP em XG.

O ponto hachurado, em destaque, mostra o ponto de estudo nesse trabalho (1,020 % m/m de AMP e 1,300 % m/m de XG). Nesse caso, as emulsões são do tipo AMP em XG.

FIGURA 22: DIAGRAMA DE FASES PARA A MISTURA AQUOSA DE XG E AMP. O CÍRCULO HACHURADO ILUSTRA O PONTO DE TRABALHO DESSE PROJETO.



FONTE: Adaptado de Hazt et al. (2020).

4.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS EMULSÕES COM NANOCRISTAIS SULFATADOS E FOSFATADOS

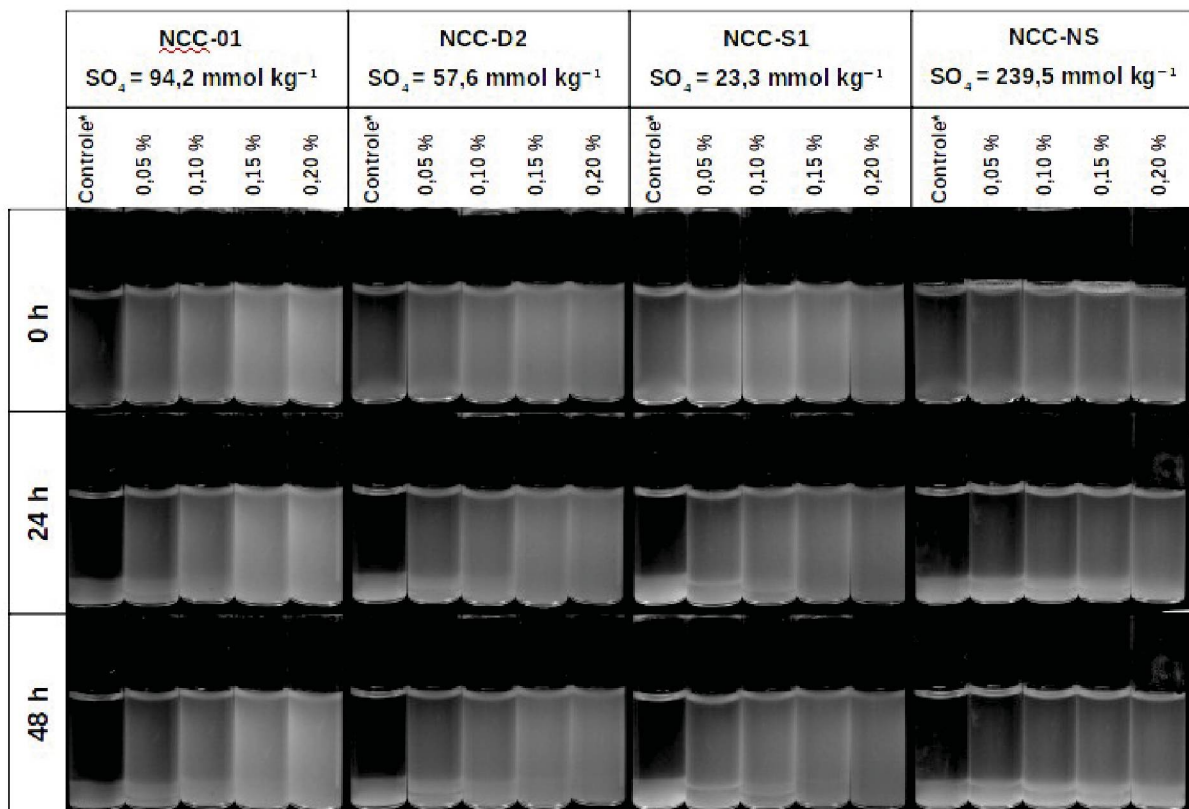
Foram preparadas emulsões, com quatro concentrações de cada nanocristal (NCC-01, NCC-D2, NCC-S1 e NCC-NS), cada um com um teor de sulfato diferente. A metodologia para o preparo está descrita na seção 3.7. As emulsões foram avaliadas até 48 h e o registro das imagens pode ser observado na FIGURA 23.

Para as amostras do controle, ou seja, sem partículas, a completa separação de fase dos polímeros AMP e XG ocorreu nas primeiras 24 h. Sendo a fase inferior composta por AMP, majoritariamente, devido a sua densidade de $0,994 \text{ g mL}^{-1}$, contra $0,976 \text{ g mL}^{-1}$ da XG, conforme discutido na seção 4.5. É possível notar que a amostra sem partículas separa fase muito mais rápido, isso sugere que os nanocristais causam um efeito de retardamento na separação das fases.

Após 24 h, as emulsões com nanocristais em menor concentração (0,05 %) começam a separar fase, contudo, a fase superior (com XG) ainda apresenta uma turbidez, o que pode indicar um sistema ainda parcialmente emulsionado. Amostras

com maior concentração de nanocristais apresentam-se mais turvas e a separação de fases não é tão pronunciada, mesmo após 48 h. Esse comportamento é evidenciado, independente do teor de sulfato do cristal. Para amostras com concentração de 0,20 % de nanocristais não é observado separação de fases até 96 h.

FIGURA 23: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SEPARAÇÃO ENTRE FASES, PARA MISTURA DE AMP (1,02 % M/M) COM XG (1,30 % M/M), COM QUATRO NANOCRISTAIS (NCC-01, D2, S1 E NS) DE DIFERENTES TEORES DE SULFATO EM QUATRO CONCENTRAÇÕES (0,05; 0,10; 0,15 E 0,20 % M/M). O pH DESSAS EMULSÕES ESTÁ NUMA FAIXA ENTRE 6,5 A 7 E O EXPERIMENTO FOI CONDUZIDO EM UMA TEMPERATURA DE 25 °C.

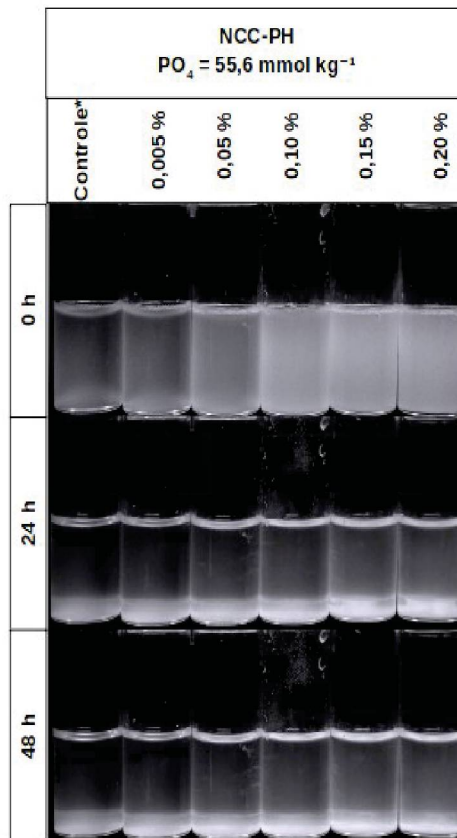


*Controle: amostras sem adição de nanocristais.

Fonte: O autor (2020).

O resultado para os nanocristais fosfatados é demonstrado na FIGURA 24. É evidente uma maior turbidez das amostras quando se aumenta a concentração de nanocristais, indicando um possível sistema emulsionado parcialmente. Após 24 h, o controle apresenta separação completa de fases e também é possível notar um corpo de fundo em todas as amostras.

FIGURA 24: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SEPARAÇÃO ENTRE FASES, PARA MISTURA DE AMP (1,02 % M/M) COM XG (1,30 % M/M), CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE FOSFATADOS (NCC-PH). O pH DESSAS EMULSÕES ESTÁ EM UMA FAIXA DE 6,5 A 7 E O EXPERIMENTO FOI CONDUZIDO EM UMA TEMPERATURA DE 25 °C.



FONTE: O autor (2020).

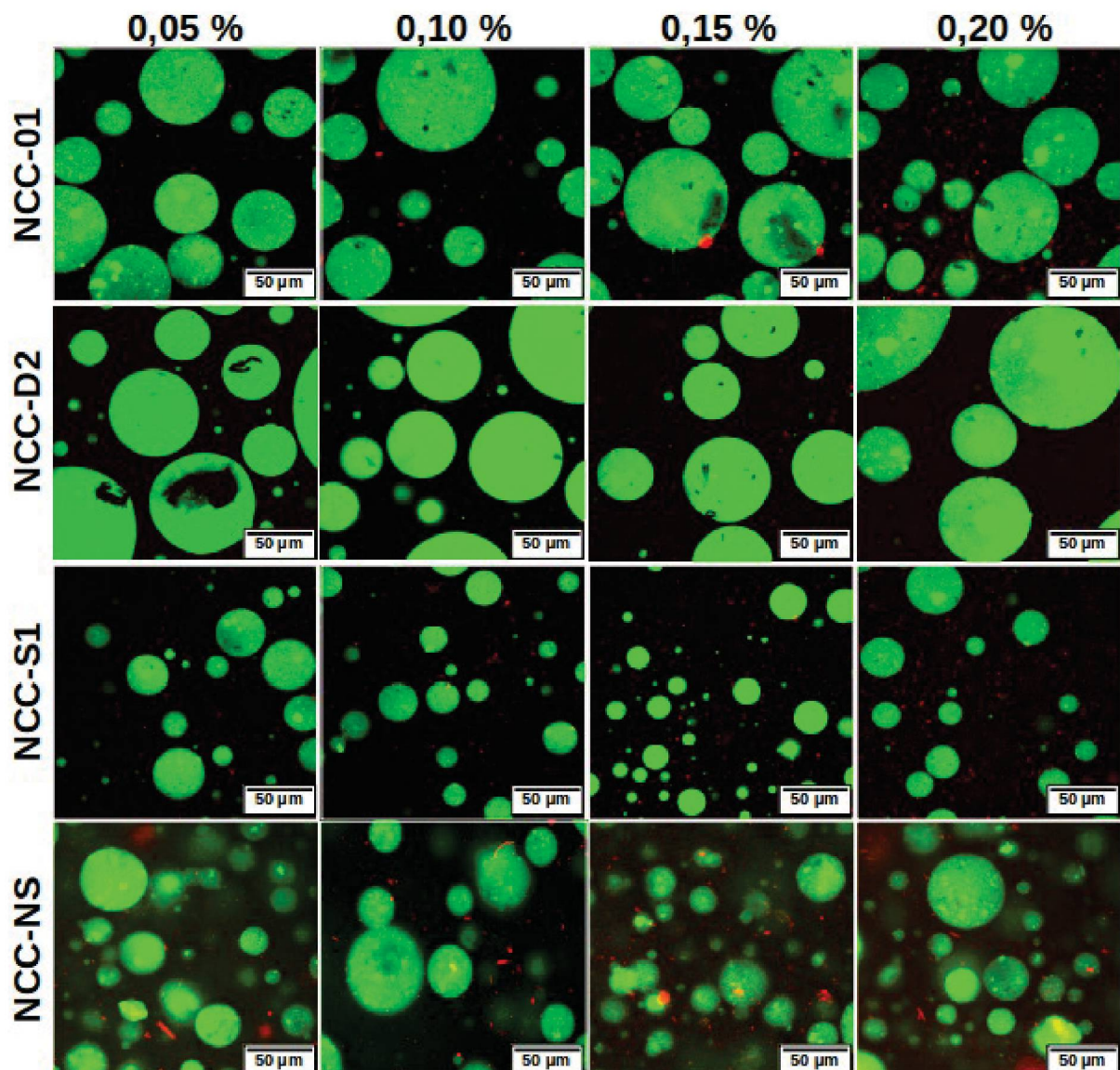
A suspensão de nanocristais fosfatados é instável, como também reportado por HAO et al. (2015). Isso pode decorrer pelo fato de que há uma diversidade nos tamanhos das partículas, como confirmado por MFA e MEV e também pelo fato de que os nanocristais podem se agregar e precipitar. Nessa situação, o ideal é realizar experimentos com suspensões de cristais estáveis, o que futuramente pode ser resolvido através de uma separação desses cristais por tamanho, através de técnicas de centrifugação ou filtração.

A técnica de microscopia confocal a laser (MCL) foi utilizada para avaliar microscopicamente essas emulsões, como descrito na seção seguinte.

4.7 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS EMULSÕES COM NANOCRISTAIS SULFATADOS E FOSFATADOS

As emulsões foram avaliadas microscopicamente através da técnica de microscopia confocal para verificar o efeito *Ramsden-Pickering* dos nanocristais de celulose. As amostras foram preparadas como explanado na seção 3.8. A fase de AMP, marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), aparece em verde e as partículas, marcadas com azul do Nilo, aparecem em vermelho na FIGURA 25.

FIGURA 25: IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER (MCL) OBTIDAS APÓS 1,5 H DE EMULSIFICAÇÃO, EM AUMENTO DE 60X, DAS EMULSÕES DE AMP EM XG (1,02: 1,30% M/M) COM AMP MARCADA COM FITC (VERDE) E QUATRO CONCENTRAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE MARCADOS COM AZUL DO NILO 2,5 PPM (VERMELHO).

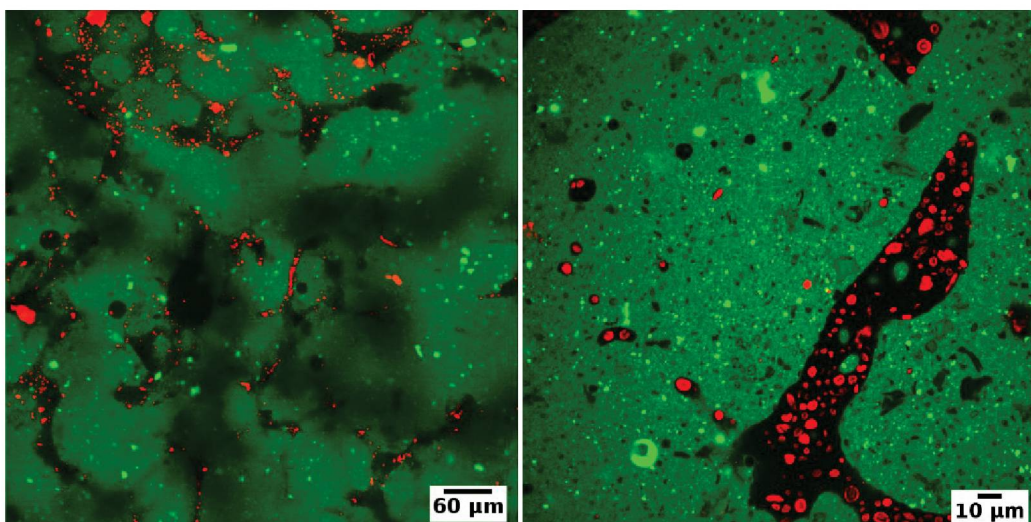


Foram analisados quatro tipos de nanocristais de celulose (NCC-01, NCC-D2, NCC-S1 e NCC-NS), os três primeiros foram secos por técnica de aspersão por *Spray Dryer*, o que resultou na formação de agregados com forma de toroides além nos nanocristais em forma de bastão. Uma amostra, constituída integralmente de nanocristais em forma de bastão, NCC-NS, também foi avaliada. Todos os cristais foram avaliados em concentrações de 0,05 %, 0,10 %, 0,15 % e 0,20 % (m/m).

Era esperado que os nanocristais, com maior teor de sulfato migrassem até a interface por interagirem menos com a XG, conforme reportado por Kittle et al. (2018) e Pirich et al. (2015), formando um fino recobrimento que seria observado em vermelho, devido ao corante. Contudo, é possível notar que não há nenhuma partícula na interface, elas estão difusas pelo meio (fase da XG) e o efeito *Ramsden-Pickering* não ocorre em nenhuma concentração de nanocristal estudada. Isso demonstra, que independente do teor de sulfato, as interações entre nanocristais de celulose e XG governam o sistema.

A FIGURA 26 ilustra bem o fato de que as partículas ficam integralmente na fase de XG, mesmo após 24 horas da emulsificação. Essas interações preferenciais, da partícula com uma das fases, podem ser deletérias em se tratando do efeito *Ramsden-Pickering*, uma vez que para que este ocorra é necessário que a partícula migre à interface.

FIGURA 26: IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL, PARA EMULSÕES DE AMP EM XG (1,02: 1,30% M/M) EVIDENCIANDO QUE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (EM VERMELHO) FICAM INTEGRALMENTE NA FASE DA XILOGLUCANA (EM PRETO), INDICANDO INTERAÇÕES PREFERENCIAIS.

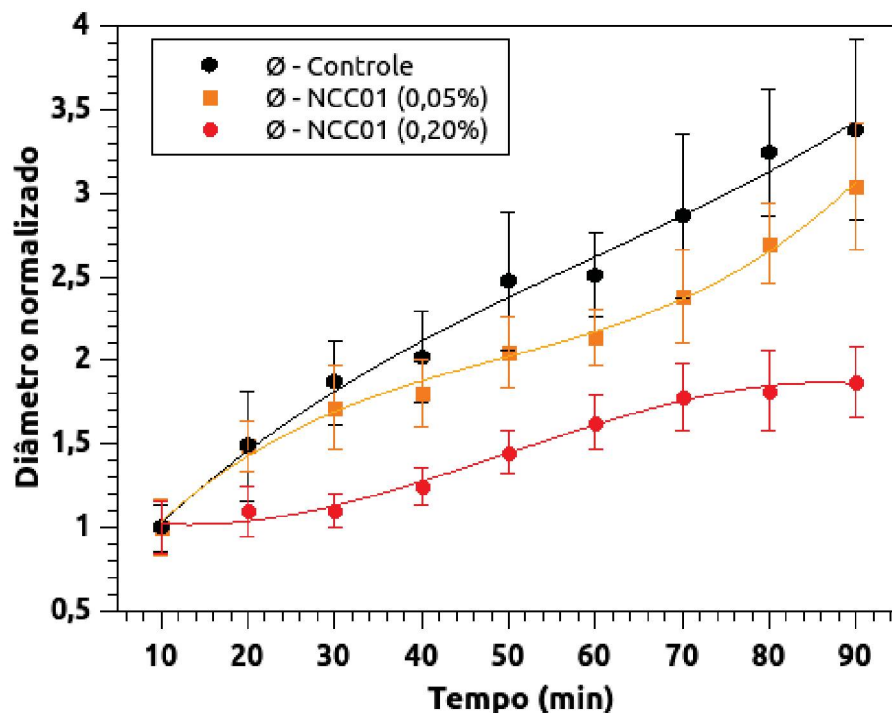


FONTE: O autor (2019).

O ensaio macroscópico evidenciou que há emulsões na presença de nanocristais de celulose em concentrações maiores que 0,10 % (m/m). Contudo, o efeito *Ramsden-Pickering* não foi observado por microscopia confocal. Isso leva a crer que há outro mecanismo de estabilização, possivelmente associado ao aumento da viscosidade ou geleificação da fase contínua de XG.

O primeiro passo para avaliar se há um atraso na coalescência foi verificar se o tamanho das gotículas de AMP, fase dispersa na emulsão com XG, muda com o decorrer tempo na presença de nanocristais. Para isso, o tamanho das gotículas de AMP foram monitorados em função do tempo, na presença de nanocristais de celulose NCC-01, em duas concentrações. Foram medidos diâmetros de cerca de 15 gotículas a cada 10 minutos, através das imagens obtidas por microscopia confocal. Os valores do diâmetro foram normalizados, dividindo-se pelo valor do diâmetro no tempo inicial que foi considerado como 10 minutos após emulsificação. O resultado é mostrado no gráfico exposto na FIGURA 27.

FIGURA 27: CRESCIMENTO DO DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS DE AMILOPECTINA NA EMULSÃO NA PRESENÇA DE NANOCRISTAIS NCC-01, COMPARADOS COM O CONTROLE, SEM PARTÍCULAS. O DIÂMETRO FOI NORMALIZADO, DIVIDINDO-SE OS DIÂMETROS PELO DIÂMETRO NO TEMPO INICIAL DE CADA AMOSTRA, QUE FOI CONSIDERADO APÓS 10 MIN DO PREPARO DAS EMULSÕES.



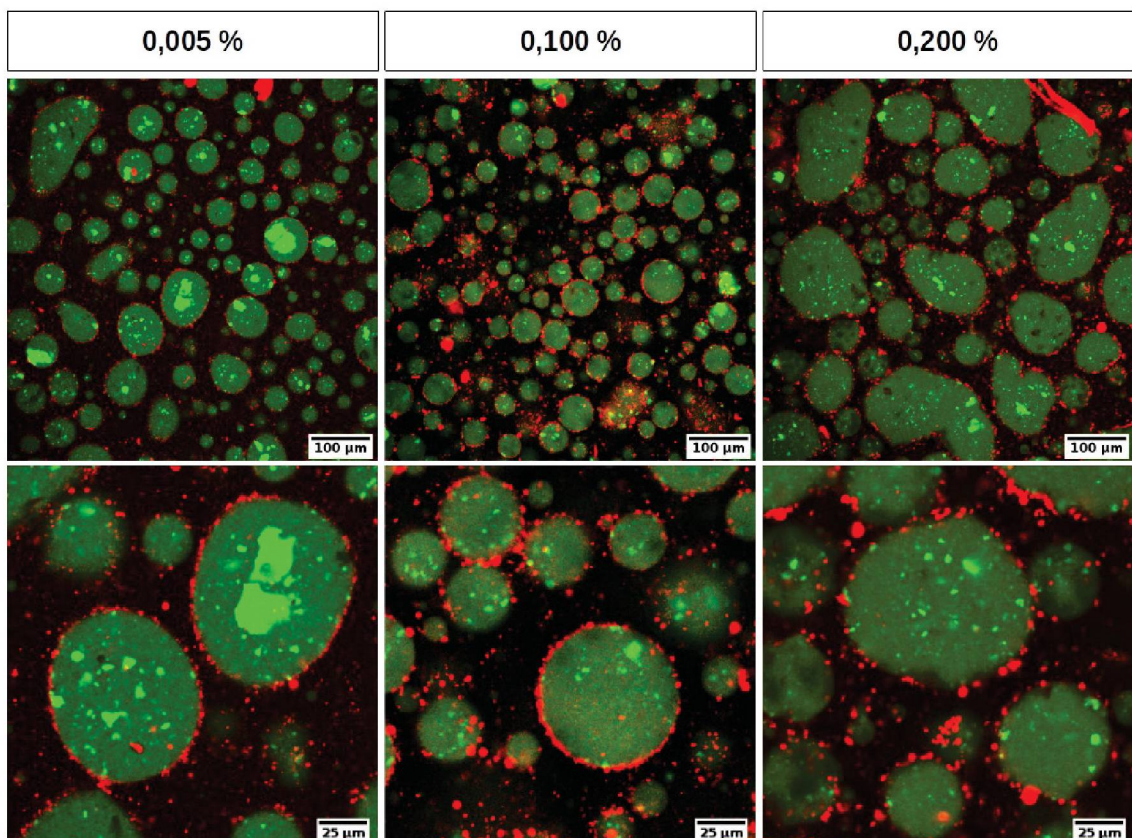
FONTE: O autor (2020).

Para uma concentração de 0,05 % (m/m) de nanocristais de celulose sulfatados (NCC-01) é possível notar que o diâmetro aumenta de forma mais lenta que um sistema sem partículas (controle). Para a concentração de 0,20 % (m/m) é possível notar que o crescimento das gotículas é desacelerado.

A presença das partículas causou um atraso na separação de fases entre AMP e XG e nesse caso, como não foi observado o efeito *Ramsden-Pickering* (FIGURA 25), o mecanismo de depleção, associado a uma alteração de viscosidade (seção 4.8), deve ser o responsável pela estabilização das emulsões. Tais aspectos serão discutidos na continuidade do texto.

As imagens de microscopia confocal para sistemas com nanocristais de celulose fosfatados são mostradas na FIGURA 28. Nesse caso, é observado o efeito *Ramsden-Pickering* nas horas iniciais.

FIGURA 28: IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER (MCL) OBTIDAS APÓS 1,5 H DE EMULSIFICAÇÃO, DAS EMULSÕES DE AMP EM XG (1,02: 1,30% M/M) COM AMP MARCADA COM FITC (VERDE) E TRÊS CONCENTRAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE FOSFATADOS, MARCADOS COM AZUL DO NILO 2,5 PPM (VERMELHO).



FONTE: O autor (2019).

As partículas esféricas localizadas na interface, em vermelho, tem aproximadamente 4 μm , o que é compatível com os nanocristais fosfatados observados por MEV. Isso demonstra que, essas partículas esféricas, possivelmente sejam as grandes responsáveis pela estabilização das emulsões. Contudo, haveria uma condição de proximidade das partículas na interface, favorecendo interações preferenciais entre os próprios cristais, desestabilizando as emulsões, já que não há efeito *Ramsden-Pickering*, para além das horas iniciais.

O que difere os cristais sulfatados (NCC-01, D2, S1 e NS) do cristal fosfatado (NCC-PH) são duas características:

– Morfologia: Como observado por MFA e MEV, na seção 4.3, os cristais sulfatados são formados por bastões com cerca de 150 nm, além de partículas micrométricas em formato de toroides. Já os cristais fosfatados, apresentam-se na forma de esferas ou discos, com um tamanho menor, cerca de 100 nm, observados por MFA e esferas de vários micrômetros de tamanho, observados por MEV.

– Estrutura cristalina: Os cristais fosfatados sofreram um processo de dissolução e recristalização, o que é evidenciado através da análise de difração de raios-X desse material. Além disso, esse processo também justifica a morfologia encontrada, como descrito por Hao et al. (2015).

A morfologia influencia como as partículas interagem e se depositam em interfaces. Uma maneira de prever quão forte uma partícula interage com a interface é a energia necessária para removê-la da mesma, ou seja, a energia livre de desorção da partícula ($\Delta_d G$). Essa energia depende do ângulo de contato e para partículas não-esféricas, como discos ou bastões, depende também da razão de aspecto, sendo que partículas com maior razão de aspecto possuem maior energia de deslocamento, ou seja, interagem mais com a interface (BINKS & HOROZOV, 2006), como no caso dos nanocristais fosfatados.

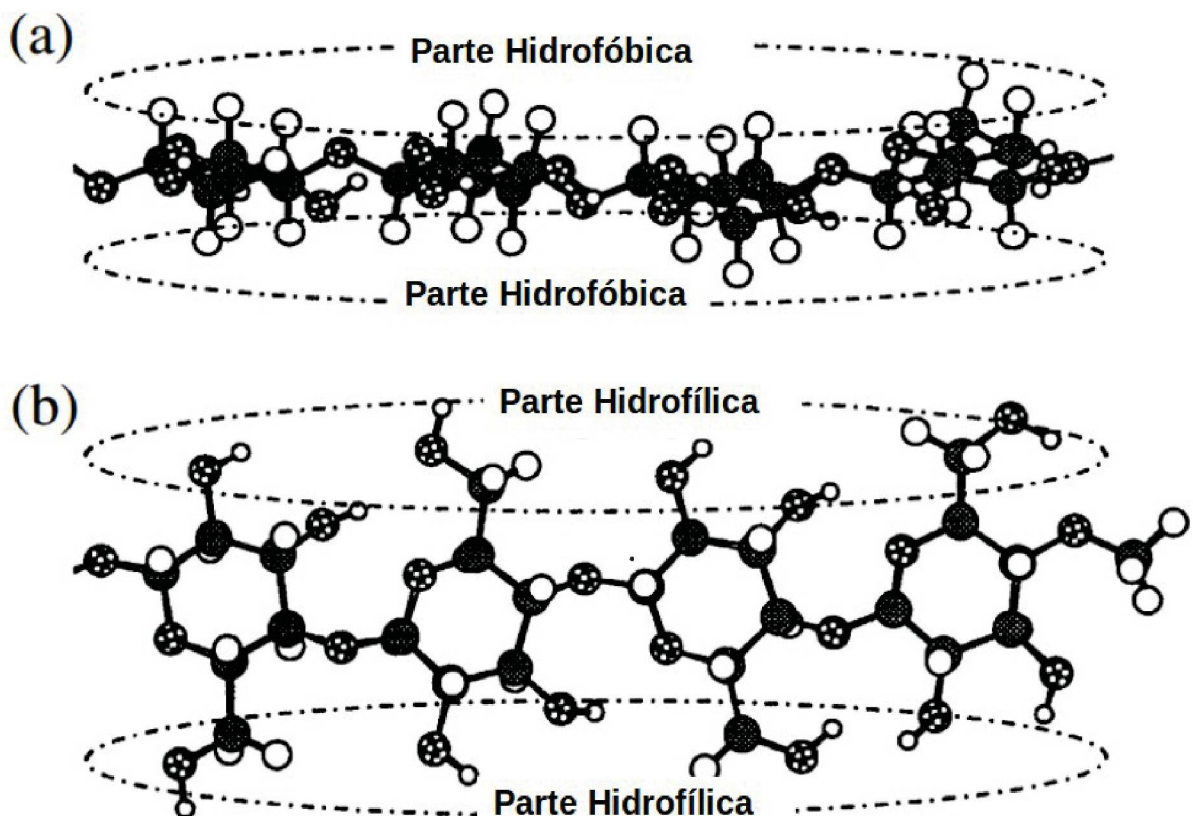
As estruturas cristalinas dos polimorfos I e II da celulose também apresentam características distintas, uma delas é a hidrofobicidade da superfície, dependendo do plano cristalino, há mais ou menos hidroxilas expostas. Estudos de Ghebreselassie (2013), mostram que o polimorfo tipo I absorve menos água que relação ao polimorfo II, o que demonstra que a celulose I é mais hidrofóbica.

Com relação à estrutura, a celulose possui um caráter anfifílico, possuindo uma região hidrofóbica e outra hidrofílica (YAMANE et al., 2006). A posição equatorial é hidrofílica devido às hidroxilas situadas na posição lateral das cadeias. Já a região axial, por possuir ligações C-H, é hidrofóbica. Essa geometria é ilustrada na FIGURA 29.

Além disso, as cadeias de XG interagem, não covalentemente, com a região hidrofóbica de cristais de celulose (PARK & COSGROVE, 2015). Então, dependendo do arranjo cristalino, o qual possuir maior hidrofobicidade interagirá mais com a XG.

Os nanocristais de celulose sulfatados (NCC-01, D2, S1 e NS) são estruturas cristalinas do tipo I e apresentam morfologia de bastões e toroides. Ou seja, sua estrutura cristalina favorece a hidrofobicidade, isso faz com que esses cristais interajam mais com a XG, impossibilitando sua migração até a interface, para que estabilize as emulsões por efeito *Ramsden-Pickering*.

FIGURA 29: PORÇÕES ANFIFÍLICAS DA CADEIA DE CELULOSE. (A) VISTA LATERAL DA CADEIA, EVIDENCIANDO QUE O EIXO AXIAL POSSUI HIDROFOBICIDADE. (B) VISTA SUPERIOR, MOSTRANDO AS LATERAIS COM HIDROXILAS, O QUE TORNA ESSA REGIÃO HIDROFÍLICA.



FONTE: O autor (2019).

Já os cristais fosfatados, devido a regeneração da estrutura de celulose tipo I, passando para a tipo II, a superfície torna-se mais hidrofílica. Com isso, há menos interação com a XG, tanto que é possível observar esses cristais na interface das emulsões de AMP em XG. Ademais, com aporte da morfologia tipo disco, há uma maior adesão à interface e isso possibilita a estabilização, por efeito *Ramsden-Pickering*, nas horas iniciais. Aparentemente há uma morfologia de nanocristais de celulose nunca utilizada para estabilizar as emulsões água-em-água, o que é promissor em detrimento aos nanocristais em forma de bastão.

4.8 AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE DA XILOGLUCANA NA PRESENÇA DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE

O comportamento de suspensões de XG já foi estudado anteriormente, do ponto de vista reológico. Shao et al. (2019) demonstraram que a XG, extraída de Tamarindo, apresenta um comportamento newtoniano em suspensões mais diluídas, como em 0,05 % (m/v) e comportamento pseudoplástico em concentrações maiores como 2,0 % (m/v). Outros estudos, demonstram que na presença de sais, as cadeias de XG podem formar redes, aumentando assim a viscosidade do meio (SAKAKIBARA et al., 2019).

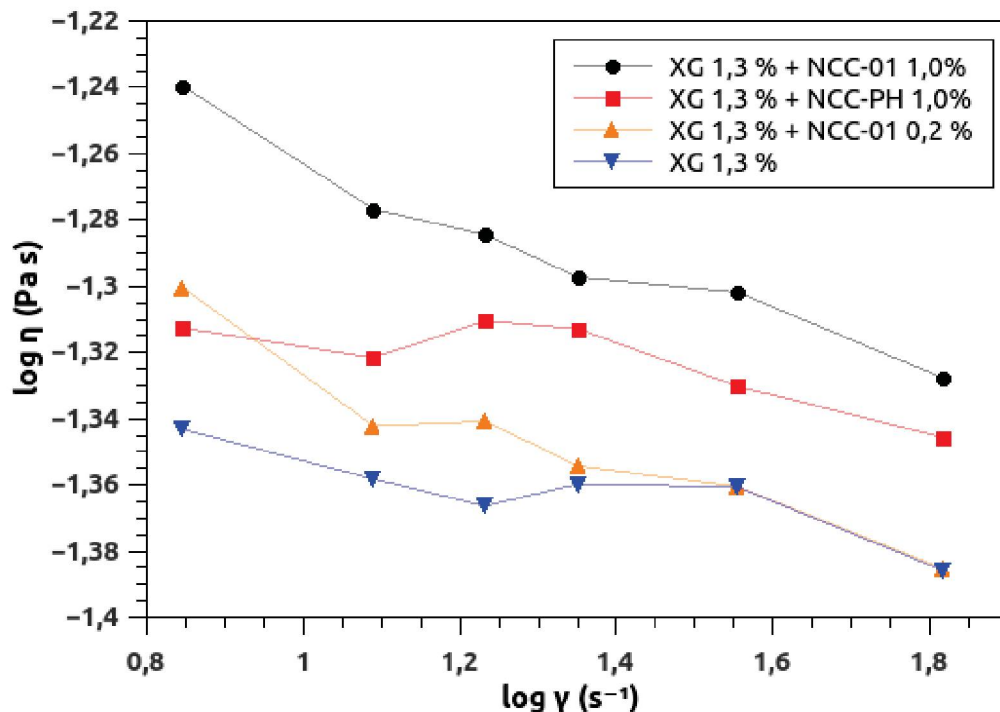
Tendo em vista que as suspensões de XG podem ter sua viscosidade alterada na presença de outras espécies, a curva de viscosidade (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) foi avaliada para a XG pura, numa concentração de 1,30 % (m/v) e com nanocristais de celulose sulfatados NCC-01, em 0,20 % (m/v) e 1,00 % (m/v) e nanocristais de celulose fosfatados NCC-PH, na concentração de 1,00 % (m/v). Essas concentrações referem-se as mesmas utilizadas nas emulsões, antes da separação de fases. O resultado pode ser observado na FIGURA 30.

Para a concentração de 1,30%, a XG apresenta um comportamento pseudoplástico, semelhante ao citado por Shao et al. (2019). Quando é adicionado na suspensão uma concentração de nanocristais de 0,20%, há um ligeiro aumento da viscosidade em baixas taxas de cisalhamento, contudo, o comportamento é muito semelhante ao da amostra sem nanocristais. Por outro lado, quando é adicionado uma concentração mais alta de nanocristais sulfatados na suspensão de XG é possível notar que a viscosidade aumenta em todas as taxas de cisalhamento.

Quando são adicionados nanocristais de celulose fosfatados, também há um ligeiro aumento da viscosidade. Porém, mesmo em concentrações iguais de nanocristais fosfatados e sulfatados, o aumento da viscosidade no caso dos fosfatados é menor. Isso corrobora com a ideia apresentada anteriormente, de que a interação de XG com nanocristais fosfatados é mais fraca.

O aumento da viscosidade das suspensões de XG na presença de cristais é capaz de diminuir a velocidade de coalescência das gotículas de AMP, estabilizando as emulsões por efeito de depleção. Isso respalda o que foi observado nas análises macroscópicas, com cristais de celulose sulfatados, mostrado na FIGURA 23 e também com o gráfico de crescimento das gotículas de AMP em XG, exposto na FIGURA 27.

FIGURA 30: CURVA DE VISCOSIDADE PARA SUSPENSÕES DE XILOGLUCANA A 1,30 % (M/V) E DUAS CONCENTRAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE, 0,20 E 1,0% (M/V).



FONTE: O autor (2020).

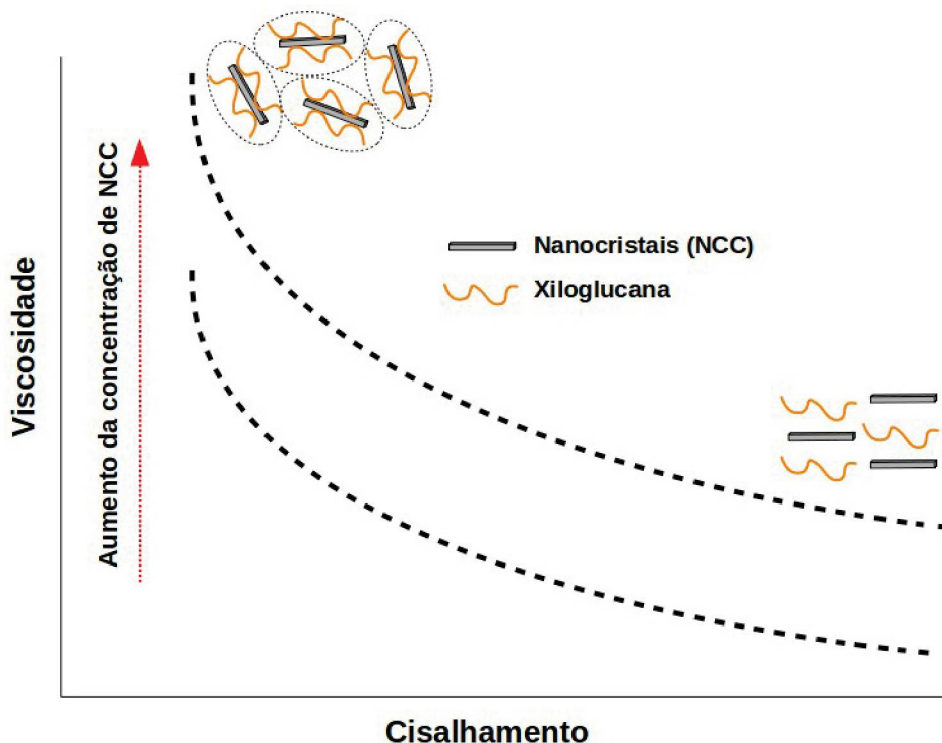
Em um estudo recente, Talantikite et al. (2019) demonstraram que a viscosidade de suspensões de nanocristais de celulose com XG depende da massa molar dessa última. Xiloglucanas com massas molares da ordem de grandeza de 8,0

$\times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ formam géis muito viscosos em altas concentrações de nanocristais. Porém, para massas molares menores, da ordem de $1,0 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, há apenas a formação de líquidos viscosos na presença de elevadas concentrações de nanocristais de celulose.

A massa molar da XG utilizada nesse projeto é de $8,3 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$, conforme citado na TABELA 6, da seção 4.4. Ou seja, nessas condições serão formados apenas líquidos viscosos.

Os nanocristais de celulose formam unidades reológicas com as cadeiras de XG, isso aumenta a viscosidade do meio. Como essa interação é, aparentemente, frágil, ela é rompida parcialmente em altas taxas de cisalhamento, conforme ilustra a FIGURA 31. Esse comportamento é compatível ao observado na FIGURA 30.

FIGURA 31: POSSÍVEL FORMAÇÃO DE UNIDADES REOLÓGICAS ENTRE XILOGLUCANA E NANOCRISTAIS DE CELULOSE, AUMENTANDO A VISCOSIDADE DO MEIO. EM ALTAS TAXAS DE CISALHAMENTO ESSA ESTRUTURA É ROMPIDA E EVIDENCIA O COMPORTAMENTO PSEUDOPLÁSTICO.

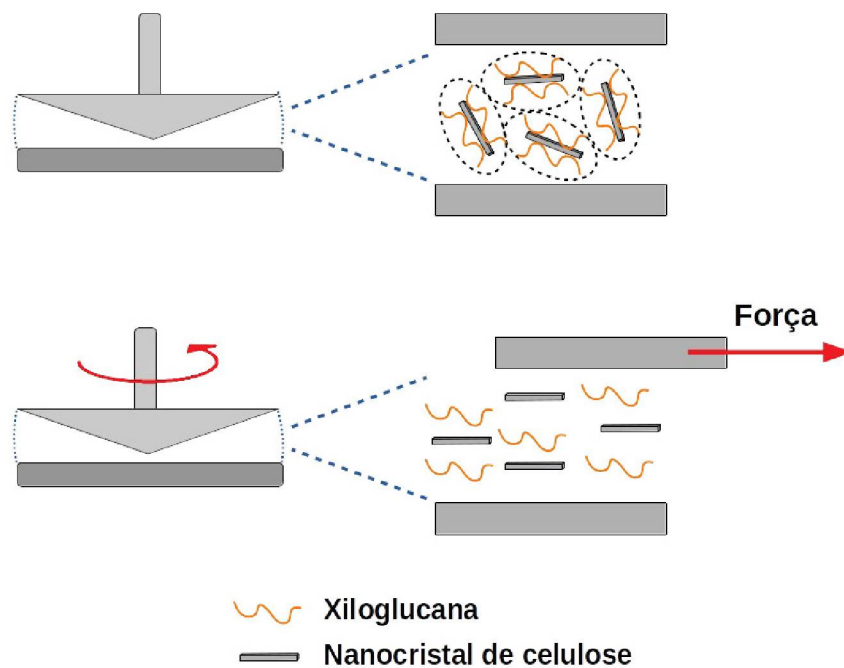


FONTE: O autor (2020).

A força intermolecular envolvida na interação nanocristal e XG é menor que força tangencial aplicada sobre a amostra para medir sua viscosidade. Quando a

amostra está em repouso, as interações intermoleculares são predominantes e a partir do momento que há cisalhamento do sistema, como ilustra a FIGURA 32, as interações são rompidas de forma parcial, como no caso de altas concentrações de nanocristais, ou de forma total.

FIGURA 32: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM REÔMETRO CONE-PLACA, PARA MEDIÇÃO DA VISCOSIDADE DO SISTEMA. A FORÇA TANGENCIAL APLICADA NA AMOSTRA É CAPAZ DE ROMPER A ESTRUTURA FORMADA.



FONTE: O autor (2020).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação aos nanocristais de celulose, o isolamento dessas partículas apresenta algumas variáveis que modificam morfologicamente e estruturalmente os cristais obtidos. A partir de uma mesma fonte de cristais, nesse caso a celulose microcristalina, se submetida à hidrólise com ácido sulfúrico resulta em nanocristais em formato de bastões, comumente reportado na literatura. Por outro lado, ao mudar o ácido para fosfórico, é possível obter estruturas distintas, como esferas ou discos

de celulose com uma ampla distribuição de tamanho. Outro fator importante é o método de armazenamento dos cristais. Caso sejam secos, por atomização, podem resultar em estruturas auto-organizadas durante a secagem. Além disso, a hidrólise pode alterar o alomorfo da celulose, partindo do tipo I para II e com isso alterar a maneira de interação com outros polissacarídeos, no caso a XG.

A ideia inicial era de que os nanocristais com diferentes teores de sulfato interagiriam de maneira distinta com a XG, sendo essa interação modulada pelo teor de sulfato: quanto maior, menor interação. Embora essa afirmativa seja verdadeira, a diferença entre as interações não foi suficiente para que essas partículas migrassem para a interface de um sistema emulsionado, sendo assim não há o efeito de estabilização por *Ramsden-Pickering*. Entretanto, a interação desses nanocristais com a XG acarreta em uma alteração na viscosidade do meio. Considerando uma emulsão, onde gotículas de AMP são a fase dispersa, a fase contínua, de XG com nanocristais, retarda o crescimento dessas gotículas, atrasando assim a coalescência por um efeito conhecido como depleção. Isso foi observado, não só para uma mistura de nanocristais de celulose em forma de toroides e bastões, mas também para nanocristais de celulose apenas em forma de bastão.

Por outro lado, para os nanocristais de celulose fosfatados foi observado o efeito *Ramsden-Pickering*, nas horas iniciais, através de microscopia confocal. Essas partículas se diferem não apenas na morfologia de nanocristais fosfatados, mas também na estrutura química da celulose, que é do tipo II. A mudança de alomorfo, de I para II, expõe mais sítios hidrofílicos nos nanocristais fosfatados e com isso modifica a interação da celulose com a XG, que é governada por domínios hidrofóbicos. Contudo, após algumas horas a emulsão começa a coalescer pois aparentemente há uma interação preferencial entre os próprios nanocristais. Ainda é um desafio a estabilização de suspensões de nanocristais fosfatados, uma vez que os mesmos precipitam com o tempo, mas isso pode ser estudado através de outras variáveis na hidrólise ou até mesmo com centrifugação ou filtração dessas suspensões, selecionando melhor a faixa de tamanho dessas partículas.

6 CONCLUSÕES

A hipótese de que o teor de sulfato de nanocristais de celulose afetasse a interação preferencial com XG e assim pudessem migrar à interface de uma emulsão água-em-água, formada por XG e AMP, estabilizando-a, foi testada a partir de vários experimentos. Macroscopicamente, as emulsões se mostraram estáveis em determinadas concentrações de nanocristais, por mais de 48 h. Contudo, microscopicamente, não foi evidenciado nenhum cristal, independente do teor de sulfato, na interface desses sistemas. Ou seja, a hipótese não foi confirmada. Ensaio adicionais comprovaram que, na presença desses nanocristais, a viscosidade da fase contínua aumenta, o que justifica a estabilização das emulsões por efeito de depleção. Por outro lado, um alomorfo diferente de nanocristais, obtidos a partir de hidrólise com ácido fosfórico, mostrou-se mais relevante por ser menos interativo com a XG. Devido a sua característica mais hidrofílica, os nanocristais fosfatados, interagem menos com a XG, migrando assim para a interface do sistema, ao menos nas horas iniciais, estabilizando parcialmente as emulsões. Deste modo, a morfologia e a hidrofiliidade dos nanocristais de celulose fosfatados foi mais determinante para a adsorção interfacial de partículas, se comparado ao teor de sulfatação dos nanocristais.

7 REFERÊNCIAS

- AZIZI, S. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 612–626, 2005.
- BAKER, A. A. et al. High-resolution atomic force microscopy of native Valonia cellulose I microcrystals. **Journal of Structural Biology**, v. 119, n. 2, p. 129–138, 1997.
- BALAKRISHNAN, G. et al. Particles trapped at the droplet interface in water-in-water emulsions. **Langmuir**, v. 28, n. 14, p. 5921–5926, 2012.
- BECK, S.; MÉTHOT, M.; BOUCHARD, J. General procedure for determining cellulose nanocrystal sulfate half-ester content by conductometric titration. **Cellulose**, v. 22, n. 1, p. 101–116, 2015.
- BINKS, B; HOROZOV, T. **Colloidal Particles at Liquid Interfaces**. New York: Oxford University Press, 2006.
- BONDESON, D.; MATHEW, A.; OKSMAN, K. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. **Cellulose**, v. 13, n. 2, p. 171–180, 2006.
- CAMARERO-ESPINOSA, S et al. Isolation of thermally stable cellulose nanocrystals by phosphoric acid hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 4, p. 1223–1230, 2013.
- CAPRON, I.; COSTEUX, S.; DJABOUROV, M. Water in water emulsions: Phase separation and rheology of biopolymer solutions. **Rheologica Acta**, v. 40, n. 5, p. 441–456, 2001.
- DE FREITAS, R. A. et al. Stabilization of Water-in-Water Emulsions by Polysaccharide-Coated Protein Particles. **Langmuir**, v. 32, n. 5, p. 1227–1232, 2016.
- DONG, S.; BORTNER, M. J.; ROMAN, M. Analysis of the sulfuric acid hydrolysis of wood pulp for cellulose nanocrystal production: A central composite design study. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 76–87, 2016.
- EATON, P. e WEST, P. **Atomic Force Microscopy**. New York: Oxford University Press, 2010.
- EICHHORN, S. J. Cellulose nanowhiskers: Promising materials for advanced applications. **Soft Matter**, v. 7, n. 2, p. 303–315, 2011.
- ESPARZA, Y. et al. Aggregate Morphology and Aqueous Dispersibility of Spray-Dried Powders of Cellulose Nanocrystals. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 43, p. 19926–19936, 2019a.

ESPARZA, Y. et al. Effects of additives on the particle morphology and aqueous dispersibility of foam-spray dried cellulose nanocrystal suspensions. **Cellulose**, v. 26, n. 16, p. 8611–8623, 2019b.

ESQUENA, J. Water-in-water (W/W) emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 25, p. 109–119, 2016.

FOSTER, E. J. et al. Current characterization methods for cellulose nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 8, p. 2609–2679, 2018.

FRENCH, A. D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, v. 21, n. 2, p. 885–896, 2014.

FRITH, W. J. Mixed biopolymer aqueous solutions - Phase behaviour and rheology. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 161, n. 1–2, p. 48–60, 2010.

GANLEY, W. J. e RYAN, P. T. e VAN DUIJNEVELDT, J. S. Stabilisation of water-in-water emulsions by montmorillonite platelets. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 505, p. 139–147, 2017.

GHEBRESELASSIE, H. Measuring the Hydrophobicity of Cellulose and the Effect of Humidity by Inverse Gas Chromatography. Thesis - Indiana University of Pennsylvania, 2013. Disponível em: <https://knowledge.library.iup.edu/etd/1149>. Acesso em: 15 dez. 2019.

GONZALEZ-JORDAN, A.; NICOLAI, T.; BENYAHIA, L. Influence of the Protein Particle Morphology and Partitioning on the Behavior of Particle-Stabilized Water-in-Water Emulsions. **Langmuir**, v. 32, n. 28, p. 7189–7197, 2016.

HAO, X. et al. Self-assembled nanostructured cellulose prepared by a dissolution and regeneration process using phosphoric acid as a solvent. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 297–304, 2015.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the Primary Cell Wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 139–168, 1989.

HAZT, B. et al. Effect of pH and protein particle shape on the stability of amylopectin–xyloglucan water-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 104, p. 105769, 2020.

JIANG, F.; ESKER, A. R.; ROMAN, M. Acid-catalyzed and solvolytic desulfation of H₂SO₄-hydrolyzed cellulose nanocrystals. **Langmuir**, v. 26, n. 23, p. 17919–17925, 2010.

KITTLE, J. D. et al. Adsorption of Xyloglucan onto Thin Films of Cellulose Nanocrystals and Amorphous Cellulose: Film Thickness Effects. **ACS Omega**, v. 3, n. 10, p. 14004–14012, 2018.

KOVALENKO, V. I. Crystalline cellulose: structure and hydrogen bonds. **Russian Chemical Reviews**, v. 79, n. 3, p. 231–241, 2010.

- KVIEN, I; TANEM, B. S. e OKSMAN, K. Characterization of cellulose whiskers and their nanocomposites by atomic force and electron microscopy. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3160–3165, 2005.
- LAHIJI, R. R. et al. Characterization of cellulose nanocrystal surfaces by SPM. **Nanotechnology** 2008, v. 2, p. 704–707, 2008.
- LOU, F. et al. Pickering emulsions stabilized by shape-controlled silica microrods. **RSC Advances**, v. 6, n. 29, p. 24195–24202, 2016.
- LU, P.; HSIEH, Y. L. Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres, and network. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 329–336, 2010.
- MADIVALA, B. et al. Exploiting particle shape in solid stabilized emulsions. **Soft Matter**, v. 5, n. 8, p. 1717–1727, 2009.
- MATALANIS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1865–1880, 2011.
- MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsion Principle, Practices, and Techniques**. London: CRC Press, 2004.
- MCNEIL, M. Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, n. 1, p. 625–663, 1984.
- NAGASAWA, K.; INOUE, Y. Solvolytic desulfation of 2-deoxy-sulfoamino-D-glucose and D-glucose 6-sulfate. **Carbohydrate Research**, v. 36, n. 2, p. 265–271, 1974.
- NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; KAMATA, T. Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. **Carbohydrate Research**, v. 58, n. 1, p. 47–55, 1977.
- NGUYEN, B. T. et al. pH-responsive water-in-water pickering emulsions. **Langmuir**, v. 31, n. 12, p. 3605–3611, 2015.
- NGUYEN, B. T. e NICOLAI, T. e BENYAHIA, L. Stabilization of water-in-water emulsions by addition of protein particles. **Langmuir**, v. 29, n. 34, p. 10658–10664, 2013.
- PARK, Y. B; COSGROVE, D. J. Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 2, p. 180–194, 2015.
- PEDDIREDDY, K. R. et al. Stabilization of Water-in-Water Emulsions by Nanorods. **ACS Macro Letters**, v. 5, n. 3, p. 283–286, 2016.
- PICKERING, S. U. Emulsions. **Journal of the Chemical Society**, v. 91, p. 2001–2021, 1907.

- PIRICH, C. L. et al. Bacterial cellulose nanocrystals: impact of the sulfate content on the interaction with xyloglucan. **Cellulose**, v. 22, n. 3, p. 1773–1787, 2015.
- RAMSDEN, W. Separation of solids in the surface layers of solutions and “suspensions”. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 72, p. 156–164, 1903.
- SAKAKIBARA, C. N. et al. Salt-induced thermal gelation of xyloglucan in aqueous media. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, p. 115083, 2019.
- SHAO, H. et al. Composition and rheological properties of polysaccharide extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed. **Molecules**, v. 24, n. 7, 2019.
- SMITH, A. M. The biosynthesis of starch granules. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 335–341, 2001.
- TALANTIKITE, M. et al. Influence of Xyloglucan Molar Mass on Rheological Properties of Cellulose Nanocrystal / Xyloglucan Hydrogels. v. 7, n. 2, p. 11–14, 2019.
- TERENCE, C. **Colloid Science Principles, methods and applications Second Edition**. Bristol: Wiley, 2010.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.
- TORLOPOV, M. A. et al. Disk-like nanocrystals prepared by solvolysis from regenerated cellulose and colloid properties of their hydrosols. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, n. July, p. 162–172, 2018.
- VIS, M. et al. Water-in-Water Emulsions Stabilized by Nanoplates. **ACS Macro Letters**, v. 4, n. 9, p. 965–968, 2015.
- VISAKH, P. M.; THOMAS, S. Preparation of bionanomaterials and their polymer nanocomposites from waste and biomass. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 121–134, 2010.
- WAGNER, R.; RAMAN, A. Atomic Force Microscope Characterization of Cellulose Nanocrystal Transverse Properties. **Cellulose**, v. 23, p. 1031-1041.
- WANG, S.; LU, A.; ZHANG, L. Recent advances in regenerated cellulose materials. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 169–206, 2016.
- WANG, W. et al. Effect of charged colloidal particles on adsorption of surfactants at oil-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 274, n. 2, p. 625–630, 2004.
- XU, J. T; CHEN, X. Q. Preparation and characterization of spherical cellulose nanocrystals with high purity by the composite enzymolysis of pulp fibers. **Bioresource Technology**, v. 291, n. June, p. 121842, 2019.

YAMANE, C. et al. Two different surface properties of regenerated cellulose due to structural anisotropy. **Polymer Journal**, v. 38, n. 8, p. 819–826, 2006.

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, n. 12, p. 3938–3944, 2013.

ZUBER, M. et al. Modification of cellulosic fibers by UV-irradiation. Part II: After treatments effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 743–748, 2012.