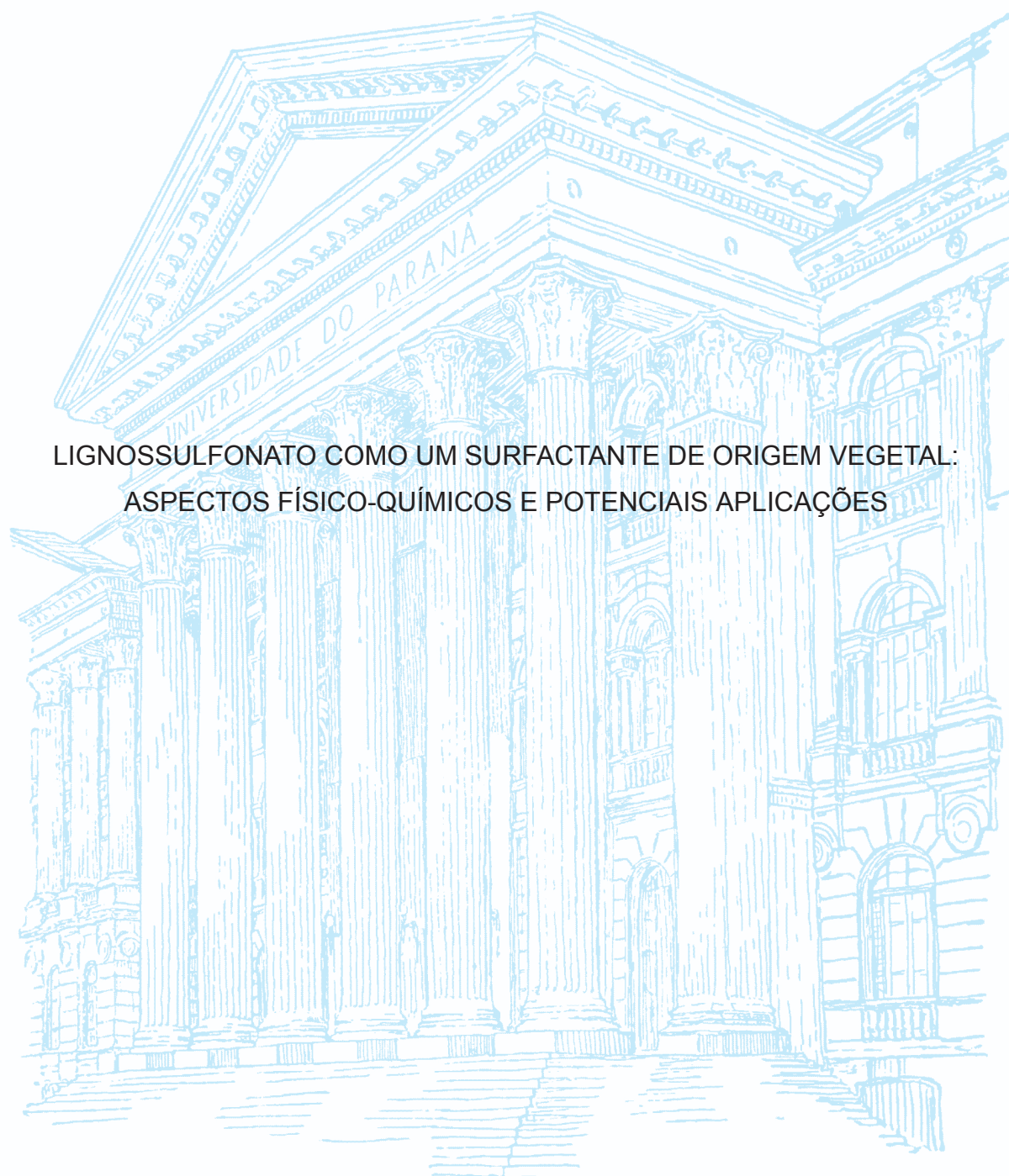


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATÁLIA MELLO DA SILVA



LIGNOSSULFONATO COMO UM SURFACTANTE DE ORIGEM VEGETAL:
ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E POTENCIAIS APLICAÇÕES

CURITIBA

2025

NATÁLIA MELLO DA SILVA

LIGNOSSULFONATO COMO UM SURFACTANTE DE ORIGEM VEGETAL:
ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E POTENCIAIS APLICAÇÕES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Coorientadora: Dr^a. Joslaine Jacumazo

CURITIBA
2025

Silva, Natália Mello da

Lignossulfonato como um surfactante de origem vegetal [recurso eletrônico]: aspectos físico-químicos e potenciais aplicações / Natália Mello da Silva. – Curitiba, 2025.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2025.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

Coorientador: Dra. Joslaine Jacumazo

1. Anti-infecciosos. 2. Tensoativos. 3. Cromatografia em gel. 4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. I. Freitas, Rilton Alves de. II. Jacumazo, Joslaine. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.792



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATÁLIA MELLO DA SILVA**, intitulada: **LIGNOSSULFONATO COMO UM SURFACTANTE DE ORIGEM VEGETAL: ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E POTENCIAIS APLICAÇÕES**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

10/07/2025 09:50:52.0

RILTON ALVES DE FREITAS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

09/07/2025 20:49:59.0

JAQUELINE CARNEIRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/07/2025 16:23:29.0

NEOLI LUCYSZYN SUCKOW

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 465406

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 465406

*Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai,
que sempre me apoiaram incondicionalmente e me
ensinaram o que é amor e dedicação; e a todas e
todos que vieram antes de mim e pavimentaram o
caminho para que eu pudesse estar aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente aos meus pais, Soraia e Valdir, por serem meus maiores apoiadores, por me ensinarem a importância do estudo, por me incentivarem na escolha do mestrado e por sempre estarem ao meu lado, pacientes e amorosos. Vocês são incríveis. Essa realização também é de vocês. À minha irmã, Yasmin, por sempre estar presente e por cuidar e fazer companhia aos nossos pais durante essa jornada também. À minha avó Nair, que, mesmo não estando mais nesse plano, me inspirou e me inspira diariamente.

Ao meu companheiro Ben-Hur, por ser lar, por todo o amor, por acreditar no meu potencial, por ser a minha principal rede de apoio nos momentos mais difíceis. Por me tranquilizar, me compreender e me acalantar sempre. Por desacelerar meus pensamentos e por me fazer enxergar as coisas com mais nitidez em tempos nebulosos.

Aos meus amigos inesquecíveis do BioPol, Jo, Nat, Ramon, Lari, Bruno, Joyce, obrigada por tudo. Pelas inúmeras piadas, risadas, momentos felizes, coxinha na Lurdes, almoços no Atacadão, passeios em lojinhas, congressos e discussões científicas. Por todo o apoio, pela esperança e por acreditarem e confiarem em mim. Pela companhia, sempre. Vocês trouxeram leveza ao processo. Ao Cassiano por toda orientação físico-química e pelas trocas farmacêuticas. Ao Leonardo por todos os debates sobre lignossulfonato. Aos demais amigos do BioPol pelas conversas e pela companhia.

À Joslaine, minha coorientadora e amiga, por ser uma das pessoas mais importantes nesse processo. Por me orientar, por ser minha confidente, por me dar esperança e me fazer acreditar em mim mesma. Por todas as incontáveis trocas sobre lignina, por toda a ajuda em experimentos, pelas aventuras, por todos os convites especiais e por sempre saber o que fazer. Sempre.

Ao professor Rilton, meu orientador, minha profunda gratidão pela orientação, paciência e pela confiança depositada ao longo desta jornada. Seu conhecimento e dedicação foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, e suas sugestões sempre pertinentes me ajudaram a enxergar além dos desafios. Agradeço pela oportunidade e manifesto minha admiração.

Aos meus amigos e amigas por me apoiarem. Aos meus amigos farmacêuticos por me estimularem a cursar o mestrado.

À estrutura e aos colaboradores de laboratórios parceiros que me auxiliaram na condução dos experimentos: ao CEB (Ahmad), ao CTAF (Elaine e Israel), à central analítica da Usina Piloto (Andrea e Patrícia), ao laboratório de cromatografia e de ressonância magnética nuclear (Bioquímica), à central analítica do Departamento de Farmácia (Gracinha e Maurício), ao LEMID (Cibele e prof. Larissa) e ao laboratório da linha de luz Cateretê (Aline). À prof. Cida e ao Ângelo pelo auxílio com a análise elementar. À Pierina pela disponibilidade no ensaio de citotoxicidade. Ao prof. Guilherme pelo convite ao CNPEM. Ao prof. Guinther pelas horas de discussão sobre SAXS, pela paciência e por toda a ajuda imensurável com as análises.

Aos membros da banca, professora Neoli, professora Jaqueline e professor Marcel por aceitarem o convite e pela disponibilidade em avaliar meu trabalho.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro.

À UFPR e ao PPGCF, pela estrutura e por me proporcionarem uma educação pública, gratuita e de qualidade. Ao RU, por fortalecer meu trabalho por meio das refeições.

A todos que de alguma forma foram importantes nessa jornada.

Às forças divinas que me guiam.

RESUMO

No presente estudo investigou-se o potencial do lignossulfonato de cálcio (LSCa) como um surfactante de origem vegetal, a partir da análise de suas propriedades físico-químicas e suas potenciais aplicações. Este trabalho baseou-se na busca por alternativas mais sustentáveis ao uso excessivo de surfactantes sintéticos, que têm gerado preocupações ambientais devido à sua toxicidade e persistência no ambiente aquático. Os lignossulfonatos, subprodutos da indústria de papel e celulose, apresentam potencial como surfactantes naturais devido à sua estrutura química, mas seu uso ainda é limitado pela falta de compreensão sobre suas propriedades físico-químicas e funcionais. Este estudo buscou caracterizar o lignossulfonato de cálcio purificado, explorando sua aplicabilidade como agente tensoativo, agente antimicrobiano e no bloqueio da radiação ultravioleta. Para isso, a pesquisa abrangeu a purificação e caracterização estrutural, química e físico-química do LSCa, por meio de técnicas como cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espalhamento dinâmico de luz laser (DLS), espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS), microscopia de força atômica (AFM) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Foram conduzidos ensaios para avaliar as propriedades tensoativas e termodinâmicas do lignossulfonato (por tensiometria e condutimetria), além de determinar seu equilíbrio hidrofílico-lipofílico. Também foram realizados testes *in vitro* de bloqueio UV, citotoxicidade, atividade antimicrobiana contra patógenos selecionados e potencial de proteção de uvas contra o fungo causador do mofo cinzento. Como resultados, o LSCa teve sua identidade verificada por meio de bandas específicas no FTIR e pelas correlações encontradas no RMN, sugestivos de ligninas. A massa molar encontrada foi de $1,19 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. As análises de tamanho e morfologia revelaram a presença de agregados fractais de cerca de 240,0 nm ($D = 2,45$) e pequenos agregados cilíndricos de aproximadamente 2,5 nm. A concentração de agregação crítica encontrada foi de $134,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o LSCa demonstrou atividade surfactante ($\pi = 25,2 \text{ mN m}^{-1}$). O equilíbrio hidrofílico/lipofílico determinado foi maior que 20, mostrando uma promissora ação detergente/solubilizante. Além disso, a atividade de bloqueio da radiação ultravioleta foi analisada, demonstrando um efeito de fotoproteção *in vitro*, mesmo em dispersões translúcidas. Testes antimicrobianos indicaram ação bacteriostática e fungistática para os microrganismos testados, com destaque para *Staphylococcus aureus*, com concentração inibitória mínima de $26,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ensaios *in vitro* e *ex vivo* investigaram o potencial do LSCa na defesa contra *Botrytis cinerea* em uvas, não revelando efeito antifúngico direto, mas sugerindo uma possível atuação na preservação dos frutos. Testes de citotoxicidade mostraram que o LSCa não possui efeitos citotóxicos sobre fibroblastos nas concentrações testadas. Os resultados demonstram que o LSCa possui propriedades relevantes para aplicação como tensoativo natural, podendo ser explorado em formulações fotoprotetoras e antimicrobianas. No entanto, estudos adicionais são necessários para aprofundar o entendimento sobre suas aplicações e otimizar seu desempenho em formulações industriais.

Palavras-chave: lignossulfonato; surfactantes naturais; fotoproteção; antimicrobianos; estabilidade interfacial.

ABSTRACT

The present study investigated calcium lignosulfonate (LSCa) as a plant-based surfactant by analyzing its physicochemical properties and potential applications. This research aligns with the pursuit of more sustainable alternatives to the excessive use of synthetic surfactants, which pose environmental concerns due to their toxicity and persistence in aquatic ecosystems. Lignosulfonates, byproducts of the pulp and paper industry, show potential as natural surfactants due to their chemical structure. However, their use is still limited by the lack of understanding regarding their physicochemical and functional properties. This study aimed to characterize purified LSCa and assess its applicability as a surfactant, particularly as an antimicrobial agent and ultraviolet (UV) blocking agent. To achieve this, the research included purification and structural, chemical, and physicochemical characterization of LSCa using techniques such as size-exclusion chromatography (SEC), nuclear magnetic resonance (NMR), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic light scattering (DLS), small-angle X-ray scattering (SAXS), atomic force microscopy (AFM), and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Experiments were conducted to evaluate its surfactant and thermodynamic properties (via tensiometry and conductimetry), as well as to determine its hydrophilic-lipophilic balance (HLB). Additionally, *in vitro* tests were performed to evaluate its UV blocking, cytotoxicity, antimicrobial activity against selected pathogens, and the potential to protect grapes from *Botrytis cinerea*, the causative agent of gray mold. LSCa's identity was confirmed through specific FTIR bands and structural correlations observed in NMR, consistent with lignin-related signatures. The determined molar mass was $1.19 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. Size and morphological analysis revealed the presence of fractal aggregates of approximately 240.0 nm ($D = 2.45$) and small cylindrical (rod-like) aggregates of around 2.5 nm. The critical aggregation concentration (CAC) was found to be $134.6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, and LSCa demonstrated surfactant activity ($\pi = 25.2 \text{ mN m}^{-1}$). The HLB value was greater than 20, indicating promising detergent and solubilizing properties. UV-blocking tests demonstrated an *in vitro* photoprotective effect even in translucent dispersions. Antimicrobial tests indicated bacteriostatic and fungistatic activity against the tested microorganisms, with particular effectiveness against *Staphylococcus aureus*, showing a minimum inhibitory concentration of $26.1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. *In vitro* and *ex vivo* assays investigated LSCa's potential in protecting grapes from *Botrytis cinerea*, revealing no direct antifungal effect but suggesting a possible role in fruit preservation. Cytotoxicity tests revealed no cytotoxic effects on fibroblasts at the tested concentrations. These findings highlight LSCa's potential as a natural surfactant with applications in photoprotective and antimicrobial formulations. However, further studies are required to enhance the understanding of its applications and optimize its performance in industrial formulations.

Keywords: lignosulfonate; natural surfactants; photoprotection; antimicrobials; interfacial stability.

LISTA DE SIGLAS

AFM – *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de Força Atômica)
ATR – *Attenuated Total Reflectance* (Reflectância Total Atenuada)
BDA – Batata Dextrose Ágar
BOD – *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
CAC – Concentração de Agregação Crítica
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLSM – *Confocal Laser Scanning Microscopy* (Microscopia Confocal de Varredura a Laser)
CMC – Concentração Micelar Crítica
DLS – *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento Dinâmico de Luz)
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco)
DP – Desvio Padrão
EHL – Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
EUA – Estados Unidos da América
FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier)
HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (Correlação Heteronuclear de Sítio Quântico Único)
LSCa – Lignossulfonato de Cálcio
MALS – *Multi-Angle Light Scattering* (Espalhamento de Luz Multiângulo)
MH – Mueller-Hinton
Mn – Massa Molar Média Numérica
Mw – Massa Molar Média Ponderada
Mz – Massa Molar Média Pelo Tamanho
NRU – *Neutral Red Uptake* (Captura do Vermelho Neutro)
P.A. – Puro para Análise
PBS – *Phosphate-Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)
Pdl – Índice de Polidispersividade
RI – *Refractive Index* (Índice de Refração)
RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SANS – *Small-Angle Neutron Scattering* (Espalhamento De Nêutrons A Baixo Ângulo)

SAXS – *Small-Angle X-ray Scattering* (Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo)

SEC – *Size Exclusion Chromatography* (Cromatografia de Exclusão por Tamanho)

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

TF – Trifenil Formazano

TTC – Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UV – Radiação Ultravioleta

UV-Vis – Radiação Ultravioleta e Luz Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1.1	Surfactantes.....	14
1.1.2	Lignina e o lignossulfonato.....	17
1.1.3	Propriedades funcionais do lignossulfonato.....	20
1.2	OBJETIVOS.....	25
1.2.1	Objetivo geral.....	25
1.2.2	Objetivos específicos.....	25
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1	MATERIAL.....	26
2.2	PURIFICAÇÃO DO LIGNOSSULFONATO DE CÁLCIO.....	27
2.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	28
2.3.1	Determinação da massa molar.....	28
2.3.2	Caracterização estrutural e funcional.....	29
2.3.3	Quantificação de grupos funcionais e teor de enxofre.....	29
2.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	31
2.4.1	Determinação de tamanho.....	31
2.4.1.1	Avaliação da influência da força iônica.....	33
2.4.2	Avaliação da morfologia e da formação de ambientes hidrofóbicos.....	33
2.4.3	Avaliação das propriedades tensoativas.....	34
2.4.4	Determinação de parâmetros físico-químicos e termodinâmicos.....	35
2.4.5	Determinação do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico.....	37
2.5	AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS APLICAÇÕES.....	38
2.5.1	Determinação da atividade de bloqueio ultravioleta.....	38
2.5.2	Avaliação de propriedades antimicrobianas.....	39
2.5.3	Avaliação do potencial de defesa contra Botrytis cinerea em Vitis vinifera L.....	40
2.5.3.1	Ensaio in vitro de crescimento micelial do patógeno Botrytis cinerea.....	40
2.5.3.2	Ensaio ex vivo em frutos para inibição do patógeno Botrytis cinerea.....	41

2.5.4	Determinação da citotoxicidade.....	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1	PURIFICAÇÃO DO LIGNOSSULFONATO DE CÁLCIO.....	43
3.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	43
3.2.1	Determinação da massa molar.....	43
3.2.2	Caracterização estrutural e funcional.....	45
3.2.3	Quantificação de grupos funcionais e teor de enxofre.....	48
3.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	49
3.3.1	Determinação de tamanho.....	49
3.3.1.1	Avaliação da influência da força iônica.....	57
3.3.2	Avaliação da morfologia e da formação de ambientes hidrofóbicos.....	58
3.3.3	Avaliação das propriedades tensoativas.....	61
3.3.4	Determinação de parâmetros físico-químicos e termodinâmicos.....	65
3.3.5	Determinação do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico.....	67
3.4	AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS APLICAÇÕES.....	69
3.4.1	Determinação da atividade de bloqueio ultravioleta.....	69
3.4.2	Avaliação de propriedades antimicrobianas.....	70
3.4.3	Avaliação do potencial de defesa contra Botrytis cinerea em Vitis vinifera L.....	74
3.4.3.1	Ensaio in vitro de crescimento micelial do patógeno Botrytis cinerea.....	74
3.4.3.2	Ensaio ex vivo em frutos para inibição do patógeno Botrytis cinerea.....	75
3.4.4	Determinação da citotoxicidade.....	78
4	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICE A – IMAGEM DE TOPOGRAFIA DE MICA (8X8 µm)	
	RECÉM-CLIVADA.....	94
	APÊNDICE B – DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS IMPORTANTES AO	
	DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE TENSIOMETRIA.....	95
	APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO DODECIL	
	SULFATO DE SÓDIO (SDS).....	99

APÊNDICE D – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE $\ln X$	
CAC EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (K).....	100
APÊNDICE E – AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS:	
IMAGENS COMPLEMENTARES.....	101

1 INTRODUÇÃO

O uso disseminado de surfactantes sintéticos tem gerado preocupações ambientais significativas devido ao seu impacto negativo nos ecossistemas aquáticos e na biodiversidade. Esses compostos, amplamente empregados nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e produtos de limpeza, reduzem a tensão superficial e interfacial dos meios em que são aplicados. No entanto, uma grande parcela desses surfactantes atinge o ambiente hídrico, afetando a microbiota, apresentando toxicidade para organismos desse meio e podendo causar irritações cutâneas em humanos (Pradhan; Bhattacharya, 2017; Johnson *et al.*, 2021). Diante desses desafios, biossurfactantes de origem microbiana têm sido explorados como alternativa mais ecológica, embora apresentem limitações em relação à escalabilidade e custos de produção. Outra abordagem promissora é o desenvolvimento de surfactantes de origem natural, obtidos a partir de biomassa vegetal, que oferecem uma alternativa renovável, biodegradável e ambientalmente sustentável (Johnson *et al.*, 2021; Fischer; Lutz-Bueno, 2023).

Em vista desse contexto, os lignossulfonatos são compostos derivados da lignina, um biopolímero, obtidos a partir do processo de polpação da madeira pelo método sulfito, provenientes, especialmente, da indústria de papel e celulose. Nesse tratamento, a lignina natural, presente na matéria-prima lignocelulósica, é fragmentada e modificada pela introdução de grupos sulfonatos, o que aumenta sua solubilidade em água e proporciona uma estrutura anfifílica. A composição química dos lignossulfonatos varia conforme a fonte vegetal e suas características estruturais, como a massa molar, são influenciadas pelas condições de extração, fracionamento e purificação. Essas diferenças estruturais impactam diretamente suas propriedades físico-químicas e sua aplicabilidade industrial (Becker; Wittmann, 2019; Ruwoldt; Planque; Øye, 2020; Ruwoldt, 2020; Lugovitskaya; Rogozhnikov, 2023).

Apesar de serem produzidos em larga escala — com uma estimativa anual de um milhão de toneladas — os lignossulfonatos ainda são considerados subprodutos da indústria e 66% do material gerado é usado como combustível para produção de energia. Suas propriedades como plastificantes, dispersantes e estabilizadores os tornam promissores para diversas aplicações mais refinadas, incluindo formulações sustentáveis e alternativas a surfactantes sintéticos, assim

como sistemas de liberação de ativos (Karagoz *et al.*, 2023; Ruwoldt, 2020; Sgarzi *et al.*, 2022).

Dadas as circunstâncias apresentadas, o lignossulfonato parece uma alternativa proveitosa como um surfactante de origem natural, já que é um biopolímero abundante, possui baixa toxicidade e boa biodegradabilidade (Ruwoldt; Planque; Øye, 2020). Ademais, novas informações sobre esse material promoveriam o seu uso em aplicações de alto valor, diminuindo a sua utilização em aplicações prejudiciais ao meio ambiente, além de promover a economia circular (Karagoz *et al.*, 2023; Tardy *et al.*, 2023). No entanto, a aplicação desse biopolímero como um surfactante requer uma compreensão mais detalhada de sua atividade de superfície em termos físico-químicos. Há uma compreensão limitada de suas propriedades de agregação e autoassociação em água, o que demanda discussões mais aprofundadas sobre o tema.

Além da caracterização físico-química, faz-se importante a investigação da toxicidade do lignossulfonato e das potenciais aplicações associadas às suas propriedades funcionais, incluindo a avaliação da atividade antimicrobiana contra diversos patógenos e a determinação de sua capacidade de bloqueio da radiação ultravioleta (Li; Peng, 2015; Guo, Y. *et al.*, 2023). Tais estudos são cruciais pois a heterogeneidade intrínseca do lignossulfonato limita a possibilidade de generalizações amplas sobre suas propriedades. Além disso, observa-se uma escassez de pesquisas que explorem essas atividades de forma isolada para o lignossulfonato, o que reforça a necessidade de uma análise mais aprofundada.

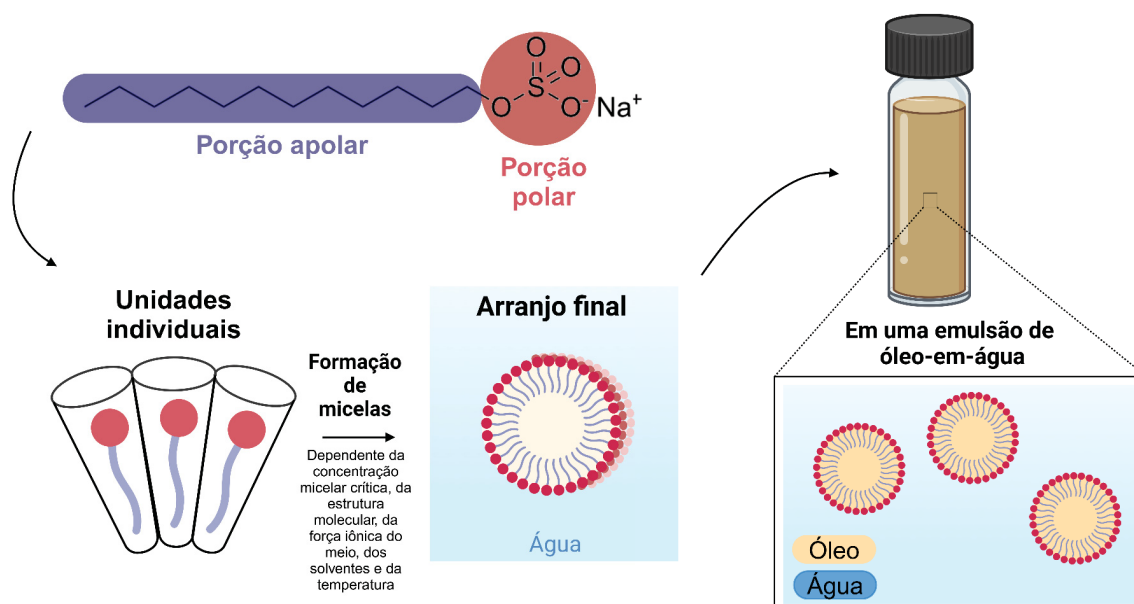
Em decorrência das problemáticas mencionadas, este trabalho busca caracterizar o comportamento do lignossulfonato de cálcio em água purificada, abordando tanto parâmetros físico-químicos quanto aqueles relacionados às suas aplicações potenciais. O objetivo é promover o uso do lignossulfonato como um surfactante de origem vegetal, destacando suas propriedades funcionais, como a atividade antimicrobiana e a capacidade de bloqueio ultravioleta, que são promissoras para agregar valor a produtos em que seja incorporado. Assim, esta proposta de grande impacto socioambiental poderá oferecer uma destinação adequada a um resíduo abundante, contribuindo para a cadeia nacional de produtos orgânicos por meio da utilização da química verde.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Surfactantes

Um surfactante, ou agente tensoativo, é uma substância que reduz a tensão superficial de um meio ou a tensão interfacial entre duas fases (IUPAC, 1997), sendo amplamente aplicado na indústria de domissanitários, cosméticos e farmacêutica. São conhecidos, tradicionalmente, por possuírem uma porção polar e outra apolar, responsáveis por adsorverem na interface entre fluidos e possibilitarem a diminuição da tensão entre as fases (Perkins, 1998), como representado esquematicamente na Figura 1. A cauda hidrofóbica (pouco polar) interage com compostos pouco polares, enquanto a cabeça hidrofílica (polar) interage com o ambiente aquoso em que está inserida.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM SURFACTANTE DE BAIXO PESO MOLECULAR, SUA AUTOASSOCIAÇÃO EM ÁGUA E SUA FUNÇÃO EM UMA EMULSÃO ÓLEO-EM-ÁGUA



FONTE: A autora (2025).

A classificação dos surfactantes pode ser feita de acordo com a presença e a natureza do grupo funcional localizado na porção polar da molécula. Dessa forma, esses agentes podem ser classificados como aniônicos, catiônicos, anfóteros ou não iônicos. Como exemplo, têm-se surfactantes contendo sulfatos, fosfatos, carboxilatos e sulfonato como aniônicos; aminas protonadas, grupos amônio

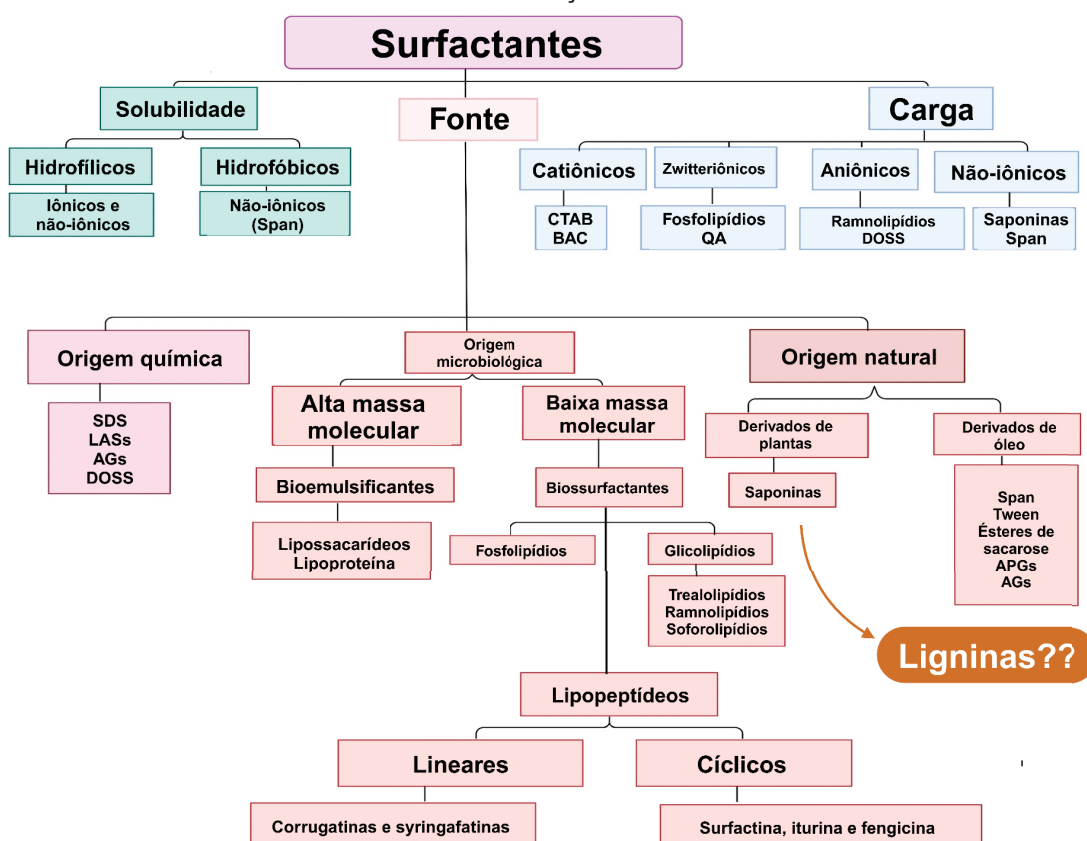
quaternário e piridínio quaternário como catiônicos; e betaínas, sulfobetaínas, aminoácidos surfactantes e derivados de imidazolina como os anfóteros. Já os surfactantes não iônicos são aqueles que não possuem carga líquida, englobando moléculas como alquil poliglicosídeos, óxidos de amina, etoxilados e polietoxilados, ésteres de sorbitano e ésteres de ácidos graxos (Alwadani; Fatehi, 2018).

As funções e as aplicações dos surfactantes, bem como a sua biocompatibilidade, podem ser influenciadas pela estrutura química e pelos grupos funcionais, como já citado, pelo tamanho e natureza da parte hidrofóbica, pelo Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL), pela concentração em solução ou dispersão e por fatores como pH do meio, temperatura e força iônica (Manaargadoo-Catin *et al.*, 2016). A determinação do EHL pode ajudar a determinar a função do componente na formulação, de acordo com a escala de Griffin (Griffin, 1949; Prista; Alves; Morgado, 1973, 1975). Dessa maneira, o agente de tensão superficial, em uma formulação, pode atuar como emulsificante, solubilizante, detergente, espumante, dispersante e umectante. Emulsificantes promovem a formação e estabilidade de emulsões em alimentos, fármacos e cosméticos, por exemplo. Solubilizantes podem ser aplicados em formulações farmacêuticas para assegurar a biodisponibilidade, enquanto detergentes e espumantes podem ser aplicados na indústria de domissanitários e cosméticos. Já os dispersantes e umectantes podem ser utilizados na área de tintas, agroquímicos e de biotecnologia (Shaban; Kang; Kim, 2020). Outra área que emprega os surfactantes de forma ampla é a indústria petrolífera (Omari *et al.*, 2021).

Os surfactantes apresentam origens diversas (Figura 2), sendo classificados como sintéticos ou naturais. Os sintéticos possuem origem química e os naturais, por sua vez, podem ser obtidos a partir de metabólitos de microrganismos ou extraídos de biomassa vegetal, por exemplo. O uso de surfactantes sintéticos é amplamente difundido e tem gerado uma preocupação ambiental relevante (Villota-Paz; Osorio-Tejada; Morales-Pinzón, 2022). Surfactantes sintéticos são os mais utilizados na indústria e são os que geram mais efeitos negativos no meio ambiente e na biosfera. A literatura relata que mais da metade do total de surfactantes produzido entra no ambiente aquático (Pradhan; Bhattacharya, 2017), acarretando um impacto negativo sobre a população microbiana desse ambiente, apresentando toxicidade e efeito na atividade biológica desses microrganismos. Além disso, essas moléculas geram efeitos prejudiciais em peixes, em plantas, e

podem ocasionar irritação cutânea em humanos (Johnson *et al.*, 2021; Effendy; Maibach, 1996). Outro fator relevante é que a fabricação de produtos químicos e polímeros sintéticos depende significativamente de recursos derivados de fontes fósseis, cada vez mais limitados e dispendiosos (Alwadani; Fatehi, 2018).

FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DE UMA CLASSIFICAÇÃO ABRANGENTE DOS SURFACTANTES



FONTE: Adaptada de Dini *et al.* (2025).

Para tentar amenizar esse problema, alguns biossurfactantes, derivados de microrganismos, principalmente, vêm sendo estudados. São alvo de atenção industrial os glicolipídios, que incluem os ramnolipídios, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*; os soforolipídeos, produzidos por *Candida* sp.; e os lipídeos de manosileritritol, produzidos por algumas espécies de fungos, por exemplo. Outras categorias de biossurfactantes englobam os lipopeptídeos e os surfactantes de alto peso molecular/poliméricos. Entre os pontos positivos do uso de biossurfactantes estão: biodegradabilidade e segurança ambiental, menor toxicidade, propriedades antimicrobianas e potencial para uso industrial, além de uma menor concentração micelar crítica quando comparados aos surfactantes tradicionais (Marchant; Banat, 2012; Jahan *et al.*, 2020). No entanto, algumas

limitações atreladas à escalabilidade, ao rendimento, ao processamento posterior e ao custo têm sido descritas (Johnson *et al.*, 2021).

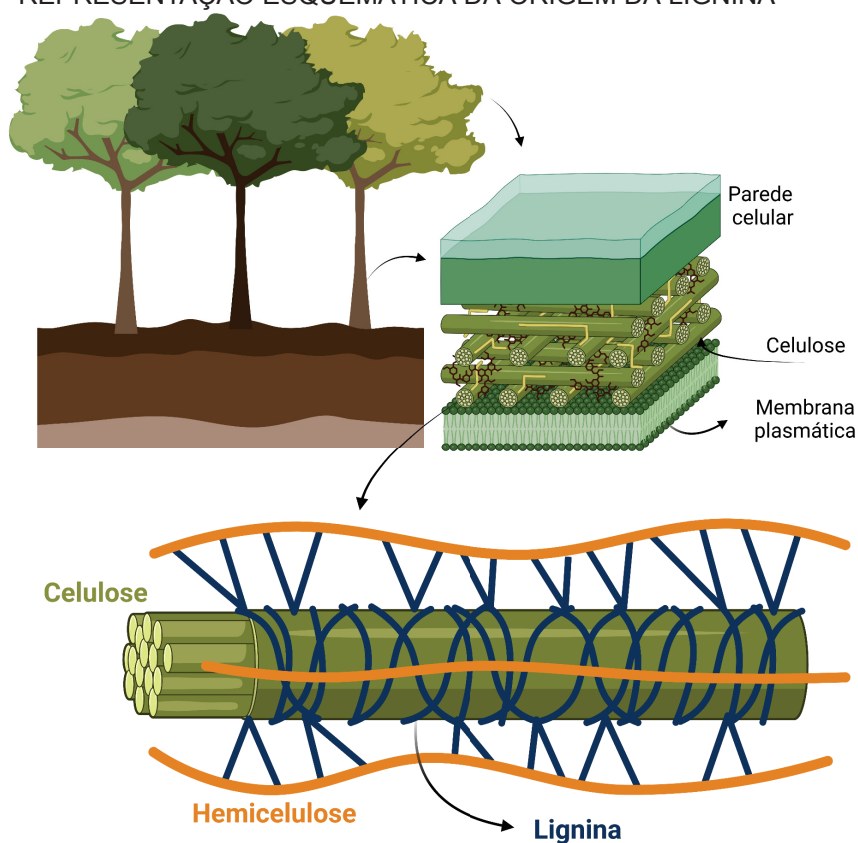
Outra possibilidade seria a substituição progressiva por surfactantes não sintéticos “verdes”, de origem natural, como uma alternativa renovável, sustentável e biodegradável, tais quais aqueles provenientes da biomassa vegetal (Fischer; Lutz-Bueno, 2023). Um exemplo de surfactante de origem vegetal são as saponinas, produzidas por espécies como *Saponaria officinalis* L., *Allium nigrum* L. e *Panax notoginseng*. Possuem ampla aplicação e uma expressiva atividade superficial; no entanto, seu uso também apresenta limitações como alto custo de produção e potencial causador de hemólise (Dini *et al.*, 2024).

Em vista do contexto exposto, para a utilização de matérias-primas sustentáveis na indústria, é fundamental que estas sejam econômicas, abundantes e facilmente convertidas em produtos de valor agregado. Nesse sentido, o material lignocelulósico é uma alternativa promissora, pois além de ser abundante, acessível e renovável, também possui propriedades de atividade superficial. Essas características o tornam uma opção relevante para processos industriais que requerem soluções sustentáveis e eficientes, ampliando suas aplicações em áreas que demandam materiais ecológicos e de alto desempenho (Isikgor; Becer, 2015).

1.1.2 Lignina e o lignossulfonato

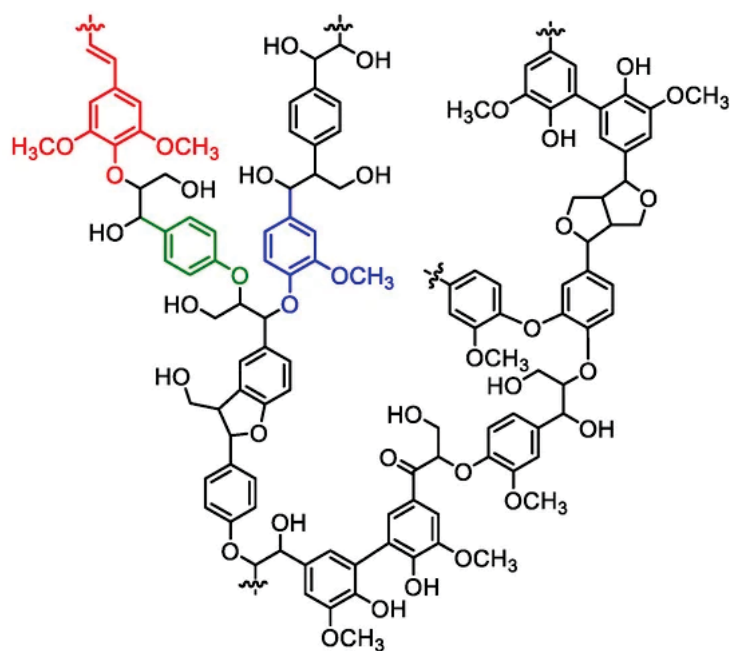
A lignina é o segundo biopolímero mais abundante na Terra. Ela faz parte da parede celular vegetal, juntamente com a celulose, e se concentra em alguns tecidos vegetais para conferir rigidez, proteção e estrutura à planta (Figura 3). É um heteropolímero aromático complexo, de massa molar variável e é composto de unidades fenilpropanóides, tais quais álcool *p*-cumarílico (unidades H), guaiacílico (unidades G) e sinapílico (unidades S), cuja proporção varia de acordo com a fonte (Becker; Wittmann, 2019). A lignina de madeira macia consiste, principalmente, de unidades G, enquanto a lignina de madeira dura contém unidades G e S; alguns vegetais, como grama ou palha, podem conter todas as três unidades. Esse polímero também é considerado um polieletrólito ramificado, dotado de grupos funcionais como hidroxilas fenólicas e alifáticas, éteres, carboxilas, carbonilas, metoxilas (Figura 4), podendo ter grupos contendo enxofre (Ruwoldt; Blindheim; Chinga-Carrasco, 2023).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORIGEM DA LIGNINA



FONTE: Adaptada de Iles (2025).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA MACROMOLECULAR DA LIGNINA



FONTE: Karunarathna; Smith (2020).

LEGENDA: As principais unidades foram coloridas. Vermelho representa álcool sinapílico; azul, álcool guaiacílico; e verde, álcool p-cumarílico.

A lignina natural ou pura é encontrada na biomassa lignocelulósica e difere da lignina técnica, que é um dos produtos dos processos de separação de biomassa. Os processos podem englobar tratamentos com enxofre (polpação sulfito e kraft - lignossulfonatos e lignina kraft, respectivamente); polpação livre de enxofre (polpação soda e polpação com solvente - lignina soda e organosolv, respectivamente); e separação em biorrefinaria (plataforma de açúcares e novos processos - lignina de hidrólise e ligninas ionosolv e aquasolv, respectivamente). Entre os diversos tipos de lignina, as mais produzidas são as ligninas provenientes de indústrias de polpa e papel, como a lignina kraft e os lignossulfonatos, categorizadas como ligninas que contêm enxofre. Estima-se que cerca de 50 milhões de toneladas de lignina kraft sejam produzidas por ano, enquanto de lignossulfonatos a produção é estimada em um milhão de toneladas por ano. Apesar da abundância, a lignina ainda é tida como um subproduto, sendo o material renovável mais subutilizado até hoje (Becker; Wittmann, 2019; Ruwoldt; Planque; Øye, 2020; Karagoz *et al.*, 2023; Ruwoldt; Blindheim; Chinga-Carrasco, 2023). No contexto nacional, o Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador de celulose do mundo, com uma produção anual de aproximadamente 21 milhões de toneladas (EPE; IEA; IBÁ, 2022). Esse volume é acompanhado pela geração de lignina e materiais derivados em quantidades proporcionais.

Os lignossulfonatos são obtidos no processo de polpação da madeira pelo método sulfito, que transforma a lignina presente na biomassa vegetal. Nessa conversão, a estrutura básica da lignina é mantida, mas o material é quebrado em fragmentos menores e modificados pela adição de grupos sulfonatos. Essa diferença estrutural confere ao polímero uma maior solubilidade em água e, devido ao aumento dos grupos polares, proporciona uma importante capacidade surfactante. A composição química do lignossulfonato depende da sua origem, sendo possível diferenciá-lo em derivado de lignina de madeira dura e de madeira macia. Da mesma maneira, as massas molares são bastante variáveis de acordo com a fonte, as condições reacionais e os procedimentos de fracionamento e de purificação (Ruwoldt; Planque; Øye, 2020; Ruwoldt, 2020; Lugovitskaya; Rogozhnikov, 2023).

1.1.3 Propriedades funcionais do lignossulfonato

Assim como a lignina, os lignossulfonatos exibem promissoras atividades antimicrobianas, antioxidantes e de fotoproteção. No entanto, apesar de suas capacidades funcionais, cerca de 66% são usados como combustível para produção de energia, o que gera preocupações ambientais (Figura 5). A produção global anual de lignina técnica é de aproximadamente 1,65 milhões de toneladas, e, dentre esse montante, os lignossulfonatos dominam 80% do mercado. As demais aplicações envolvem a produção de bens de consumo de grande escala, como briquetes de carvão, cerâmica, fabricação de compensado e como aditivos redutores de água para concreto (Karagoz *et al.*, 2023; Li; Peng, 2015; Guo, Y. *et al.*, 2023).

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS APLICAÇÕES POTENCIAIS DA LIGNINA E VALORES RELATIVOS DE DIFERENTES CLASSES DE PRODUTOS



FONTE: Adaptada de Karagoz *et al.* (2023).

Outras aplicações que têm sido relatadas estão relacionadas ao aprimoramento de massas de cimento e tinta; retardante de chama; alimentação de animais; tratamento de água; crescimento vegetal e aplicações envolvendo a fertilização do solo (Magina; Barros-Timmons; Evtuguin, 2021; Zou; Wang; Wang,

2024; Tang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023; Cirne *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2023; Kok *et al.*, 2021; Abdullah *et al.*, 2021; Alwadani; Fatehi, 2018). Muitos desses usos baseiam-se na função de dispersante e floculante do lignossulfonato. Em vista desse contexto e do potencial desse polímero, estuda-se o uso do lignossulfonato em aplicações de alto valor, como produtos farmacêuticos e químicos finos (Karagoz *et al.*, 2023). No entanto, de acordo com Sugiarto e colaboradores (2022), a variabilidade e a heterogeneidade da lignina e derivados representam fatores limitantes para os estudos e o desenvolvimento desses biopolímeros em aplicações mais refinadas, como no ramo biomédico. Isso acontece pois o material pode ser proveniente de muitas fontes e pode ser isolado por intermédio de diversos métodos de extração. Além disso, as pesquisas e aplicações atuais envolvendo esses compostos carecem de uma avaliação mais aprofundada acerca da biocompatibilidade e biodegradabilidade quando em contato com o corpo humano. Esse contexto representa um dos principais obstáculos para a utilização da lignina como um biomaterial. Dessa maneira, estudos sobre aspectos como biodegradabilidade, biocompatibilidade e toxicidade são imprescindíveis para a aplicação destes polímeros de forma segura e assertiva.

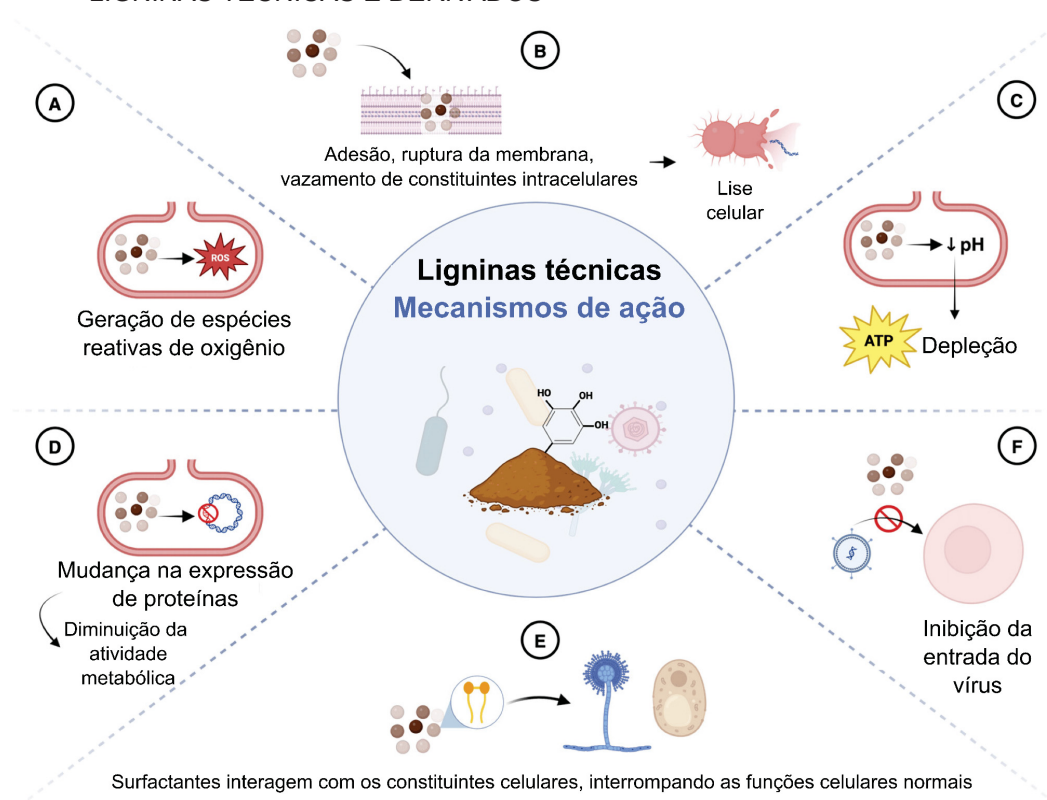
As ligninas técnicas, especialmente a lignina kraft e os lignossulfonatos, possuem relatos de atividade antimicrobiana, antioxidantes e de fotoproteção. A atividade de bloqueio da radiação ultravioleta já foi descrita por alguns autores e está relacionada à capacidade de absorção da radiação por grupos funcionais como hidroxilas fenólicas e cetonas, por exemplo (Lee *et al.*, 2020). A natureza polifenólica natural desses compostos foi explorada por Lorquin e colaboradores (2021) para produzir um protetor solar ecológico a partir de emulsões de óleo-em-água com lignossulfonato. O biopolímero foi utilizado como material complementar a filtros solares orgânicos e teve um efeito positivo no fator de proteção solar com diminuição da concentração geral dos filtros aplicados nas formulações. Os autores também relatam a formação de micelas pelo lignossulfonato de sódio e encapsulação dos ativos de proteção solar. Mais recentemente, Zhang e colaboradores (2022) desenvolveram microcápsulas de filtro solar de lignossulfonato de cor clara com bloqueio UV reforçado e um bom desempenho de adesão na pele. Nota-se, em vista desse contexto, que a literatura carece de uma avaliação preliminar da atividade de bloqueio UV do lignossulfonato de forma macromolecular

e isolada, avaliando-se as concentrações ideais aparentes de bloqueio em amplo espectro UV (A, B e C).

A atividade antimicrobiana das ligninas técnicas também já foi observada por alguns autores. Verrillo e colaboradores (2021) relataram que os lignossulfonatos, dentre as ligninas testadas, mostraram a maior capacidade antimicrobiana frente a alguns microrganismos, com atividade expressiva contra bactérias gram-positivas. Essa propriedade observada foi positivamente correlacionada com o conteúdo aromático/fenólico da lignina. Kim e colaboradores (2013) mostraram que nanopartículas de lignossulfonato produzidas a partir de lignossulfonato de cálcio tiveram um efeito bacteriostático contra várias espécies de bactérias. Com relação à atividade antifúngica, Jha e Kumar (2018) notaram uma potente ação do lignossulfonato de sódio contra *Candida* spp. O desenvolvimento e a descoberta de novos agentes antimicrobianos podem colaborar com a problemática da resistência fúngica e bacteriana contra ativos antimicrobianos tradicionais. É relevante mencionar, também, que o lignossulfonato já demonstrou atividades antivirais potenciais contra o vírus do herpes simples e o vírus da imunodeficiência humana (Gordts *et al.*, 2015).

Reyes, Ma e Romero (2024) relataram que, atualmente, os mecanismos de ação das atividades antimicrobianas das ligninas técnicas podem ser diferentes (Figura 6). Outros fatores que geram desafios para a comparação entre estudos sobre a ação antimicrobiana de ligninas técnicas compreendem a ampla variedade e heterogeneidade de ligninas técnicas e derivados, assim como metodologias divergentes para avaliar a atividade antimicrobiana. Esses aspectos justificam e ressaltam a importância da realização de testes antimicrobianos para diferentes tipos de lignina, mesmo que sua atividade já tenha sido documentada na literatura.

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS ANTIMICROBIANOS DE LIGNINAS TÉCNICAS E DERIVADOS



FONTE: Adaptada de Reyes; Ma; Romero (2024).

Estima-se que os lignossulfonatos possuam um amplo espectro de atividades antimicrobianas. No entanto, há a hipótese de que as fortes propriedades surfactantes dos lignossulfonatos, decorrentes da presença dos grupos sulfonato, possam explicar sua atividade antimicrobiana. A organização e a distribuição dos grupos carregados e neutros nas superfícies macromoleculares dos lignossulfonatos influenciam sua capacidade de interação com outras moléculas e, consequentemente, sua atividade antimicrobiana. Dessa maneira, a interação com componentes celulares, tais quais lipídios e proteínas, podem interromper as funções celulares fisiológicas, causando efeitos negativos no crescimento e na viabilidade das células microbianas (Reyes; Ma; Romero, 2024; Núñez-Flores *et al.*, 2012; Xu; Ferdosian, 2017; Vainio *et al.*, 2012).

A necessidade de novos agentes antimicrobianos, visando contornar a resistência, também se estende a algumas espécies de fungos filamentosos, como o *Botrytis cinerea*. Esse patógeno é o responsável por ocasionar a doença popularmente conhecida como podridão cinzenta ou mofo cinzento, que acomete diversas partes dos vegetais e diversos tipos de cultura. Evidencia-se, aqui, o

acometimento desse fungo em videiras e uvas (*Vitis vinifera* L.). Os tecidos mais vulneráveis à ação do patógeno, na videira, são flores, brotos jovens e folhas, assim como as bagas de uva. Além disso, a infecção por *Botrytis cinerea* é responsável por diversas mudanças bioquímicas, como a produção de lacases, que ocasionam a alteração das propriedades organolépticas do suco de uva e, consequentemente, do vinho.

Dessa maneira, para tentar amenizar esse problema, o uso profilático de fungicidas sintéticos foi adotado, fato que causou uma resistência do fungo a fungicidas tradicionais (Jacometti; Wratten; Walter, 2010; Ampese; Almança, 2019). Em vista desse contexto, nota-se que, até o presente momento, não foram encontrados estudos que avaliem a atividade antimicrobiana do lignossulfonato frente ao fungo filamentoso *Botrytis cinerea* e a atividade de proteção da uva frente a patógenos. Essa alternativa promoveria o uso de um importante subproduto industrial e o fomento da economia circular, especialmente no âmbito agrícola.

Por fim, uma outra propriedade funcional do lignossulfonato está relacionada, também, à presença de grupos polares e anéis aromáticos apolares. Essa configuração molecular confere à macromolécula uma capacidade surfactante, podendo ser aplicada como emulsionante e estabilizante em diversas formulações. Alguns autores citam que a estabilização de emulsão com lignossulfonato requer a aplicação de uma grande quantidade de energia e alto cisalhamento, já que o efeito na tensão interfacial é menor do que os surfactantes comerciais (Ruwoldt, 2020; Ruwoldt; Planque; Øye, 2020). Apesar disso, Gundersen, Sæther e Sjöblom (2001) mostraram que lignossulfonatos de alta massa molar foram capazes de produzir gotículas de óleo em água estáveis à coalescência.

Lauten, Myrvold e Gundersen (2010) relataram a produção de emulsões altamente estáveis com lignossulfonato, especialmente para aplicações agroquímicas. Anos depois, Nguyen, Hwang e Park (2013) desenvolveram nanoemulsões estabilizadas por uma camada dupla de lignossulfonato e quitosana. Ruwoldt, Simon e Øye (2020) obtiveram emulsões água-xileno estabilizadas por lignossulfonatos por intermédio do mecanismo de gelificação interfacial na presença de cátions di e trivalentes. A influência de álcool nesses sistemas também foi testada, revelando que a estabilização de emulsões óleo-em-água foi mais eficiente na presença de álcoois de baixa massa molar (Ruwoldt; Øye, 2020).

Ruwoldt e colaboradores (2024) mostraram que uma lignina técnica (lignina kraft esterificada) foi capaz de produzir emulsões óleo-em-água estáveis, com melhor desempenho utilizando óleos alifáticos. Outra aplicação relatada por Gao *et al.* (2020) foi a utilização do lignossulfonato como estabilizante de uma dispersão coloidal, mostrando uma melhor estabilidade de armazenamento de resinas de ureia formaldeído, sem influenciar na resistência ao cisalhamento.

Portanto, os mecanismos relatados para a estabilização de dispersões com lignossulfonato envolveram repulsão eletrostática, impedimento estéril, estabilização por partículas e formação de uma camada viscoelástica na interface (Ruwoldt, 2020). Diante das diversas evidências sobre a capacidade do lignossulfonato em estabilizar emulsões e dispersões coloidais, torna-se fundamental aprofundar o estudo dos mecanismos interfaciais e das propriedades tensoativas deste polímero para otimizar sua aplicação como surfactante e aprimorar o controle das formulações.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar as características físico-químicas e estruturais do lignossulfonato de cálcio purificado (LSCa) e investigar aspectos biológicos relacionados à sua aplicação, com o objetivo de promover seu uso eficaz como surfactante de origem vegetal.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Purificar o lignossulfonato de cálcio;
- b) Realizar a caracterização química e estrutural do LSCa, visando a verificação da sua identidade, presença e quantificação de grupos funcionais, quantificação de teor de enxofre e obtenção de parâmetros como massa molecular;
- c) Caracterizar as estruturas e agregados macromoleculares do LSCa quanto ao tamanho e ao potencial Zeta, com e sem a influência de força iônica constante;

- d) Analisar a morfologia das estruturas e agregados moleculares do LSCa e a formação de ambientes hidrofóbicos;
- e) Analisar as propriedades tensoativas do LSCa e determinar parâmetros físico-químicos importantes para um surfactante;
- f) Determinar parâmetros físico-químicos e termodinâmicos de agregação do LSCa;
- g) Determinar o Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico do LSCa, necessário para entender sua função como tensoativo;
- h) Analisar o potencial bloqueio da radiação ultravioleta do LSCa;
- i) Analisar a susceptibilidade dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* frente ao tratamento com LSCa e determinação da concentração inibitória mínima (CIM);
- j) Analisar a atividade do LSCa contra *Botrytis cinerea*, em experimento *in vitro* (crescimento micelial) e *ex vivo* (em frutos de *Vitis vinifera* L. “Thompson Seedless”);
- k) Determinar o potencial citotóxico do LSCa em fibroblastos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Lignossulfonato de cálcio foi cedido pela MC Química (Brasil). Dodecil sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate* - SDS) foi obtido da Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América - EUA) e empregado como surfactante aniônico comercial padrão, para fins comparativos. Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) foi adquirido da CRQ (Brasil); ácido clorídrico (HCl), da Dinâmica Química Contemporânea (Brasil); cloreto de sódio P.A. (NaCl), da ALPHATEC (Brasil); acetona P.A., da Labsynth (Brasil); vaselina líquida USP (óleo mineral), da BIOTEC (Brasil); azida sódica (NaN₃), vermelho do Nilo, vermelho neutro e água deuterada (D₂O) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). DMEM *high glucose* (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, com glucose 4,5 g L⁻¹), soro fetal bovino, PBS (tampão fosfato salino, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*, com pH 7,2-7,4), tripsina-EDTA e penicilina/estreptomicina foram obtidos da Gibco Scientific (EUA). Linhagem de células L929 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro

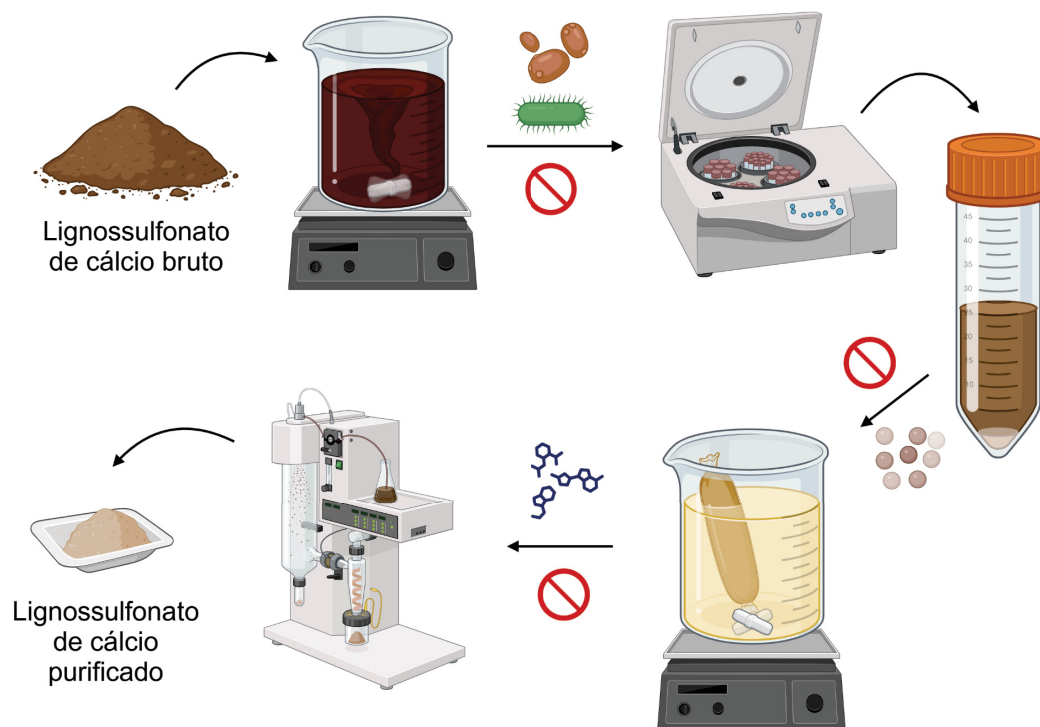
(Brasil). Água purificada (condutividade $\leq 1,3 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C) e ultrapurificada (condutividade $\leq 0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C) foram obtidas por purificador de água MilliQ (Millipore, EUA) (Brasil, 2019).

2.2 PURIFICAÇÃO DO LIGNOSSULFONATO DE CÁLCIO

Inicialmente, realizou-se a purificação do lignossulfonato de cálcio a fim de reduzir significativamente eventuais contaminações microbiológicas, partículas sólidas acima do regime coloidal, sais, carboidratos simples e demais moléculas de baixa massa molar. Estudos anteriores do grupo, ainda não publicados, evidenciaram as diferenças entre o material bruto e purificado e comprovaram a necessidade da purificação.

Dessa forma, o lignossulfonato de cálcio bruto foi disperso em uma solução aquosa de NaN_3 $0,3 \text{ g L}^{-1}$ por 20 minutos (na proporção 1:3) e centrifugado a 5000 g por 15 minutos em centrífuga LabConser (Brasil). Em seguida, o sobrenadante foi submetido à diálise contra água purificada em membrana de celulose $12\text{-}14 \text{ kg mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, EUA), por um período de 24 horas, com trocas periódicas de água. Por fim, o material retido na membrana foi submetido à secagem em Spray Dryer LM MSD 1.0 (LabMaq, Brasil), utilizando temperatura de 190°C , vazão de ar de 30 L min^{-1} e de amostra de $0,3 \text{ L h}^{-1}$. Após a secagem, o material foi coletado e armazenado em recipiente adequado sob refrigeração (2 a 8°C). O processo de purificação está representado de forma esquemática na Figura 7. Todos os ensaios posteriores foram conduzidos utilizando lignossulfonato de cálcio purificado (LSCa).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO LIGNOSSULFONATO DE CÁLCIO



FONTE: A autora (2025).

2.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

2.3.1 Determinação da massa molar

O perfil de eluição das amostras foi determinado por cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês *Size Exclusion Chromatography* - SEC), utilizando espalhamento estático de luz laser multiângulo (inglês *Multi-Angle Light Scattering* - MALS; Wyatt Technology, EUA) e detectores de índice de refração (do inglês *Refractive Index* - RI; Waters 2410, EUA). A cromatografia foi realizada em um sistema Waters contendo quatro colunas de permeação em gel embaladas com Ultrahidrogel® 2000, 500, 250 e 120, conectadas em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 g mol⁻¹, respectivamente. O eluente empregado foi uma solução aquosa de NaNO₃ (0,1 mol L⁻¹) contendo 0,5 g L⁻¹ de NaN₃ na vazão de 0,6 mL min⁻¹, a 25 °C. A amostra de LSCa, previamente filtrada em membrana de acetato de celulose com abertura de poro de 0,22 µm (Filtrilo, Brasil), foi injetada (100 µL) na concentração de 21 µmol L⁻¹. O valor de dn/dc utilizado foi o de 0,192 mL g⁻¹ (Fredheim; Braaten; Christensen, 2002). Os dados de SEC foram coletados e

processados no *software* Wyatt Technology ASTRA, versão 4.70.07, para obtenção dos valores de massa molecular. Os gráficos foram elaborados utilizando o *software* OriginPro 8.5.

2.3.2 Caracterização estrutural e funcional

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e de carbono 13 (^{13}C) foram realizadas em espectrofotômetro DRX 400 Avance (Bruker, Alemanha) em tubos de 5 mm de diâmetro. As amostras foram dispersadas em D_2O ($252,3 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os espectros foram obtidos a 70°C e os deslocamentos, em ppm, foram determinados utilizando-se acetona como padrão interno. Os deslocamentos da acetona utilizados para calibração do espectro foram de 2,22 ppm e 30,89 ppm, de acordo com Babij *et al.* (2016). Os espectros de RMN ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz. Os espectros representados no trabalho foram adquiridos na forma de RMN bidimensional - HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), elaborados e analisados com o auxílio do programa TopSpin 4.4.1 (Bruker, Alemanha). As representações esquemáticas foram desenvolvidas no *software* ChemSketch e no Inkscape 1.3.

As análises de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR) foram realizadas usando um espectrofotômetro FT-IR ALPHA (Bruker, Alemanha) no modo de reflectância total atenuada (do inglês *Attenuated Total Reflectance* - ATR). A amostra (2 mg) foi colocada diretamente em contato com o laser e o espectro foi adquirido instantaneamente (64 scans com resolução de 4 cm^{-1} e número de onda de $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$) e analisado utilizando-se o *software* OPUS viewer (Bruker, Alemanha). Os gráficos foram elaborados utilizando o *software* OriginPro 8.5.

2.3.3 Quantificação de grupos funcionais e teor de enxofre

O teor de carboxilas foi determinado a partir de titulação ácido-base, utilizando-se uma solução aquosa de NaOH 5 mmol L^{-1} como titulante. A solução básica foi padronizada com padrão primário biftalato de potássio. Foram preparadas dispersões do polímero de igual concentração em uma solução aquosa de HCl 5 mmol L^{-1} e foi utilizado HCl 5 mmol L^{-1} como branco. Levando em consideração que

as duas dispersões estão em HCl, a diferença do volume entre as titulações será o necessário para titular os grupamentos carboxila, considerando-se a estequiometria 1:1. A diferença de volume entre as titulações foi utilizada para calcular o teor de carboxilas em % (m m⁻¹), em relação à massa de polímero envolvida no experimento. O teste foi realizado em duplicata experimental e os resultados expressos como média de % ± desvio padrão (DP).

Para a determinação do teor de hidroxilas fenólicas foi utilizada a metodologia de Wexler (1964). Inicialmente, foram realizadas dispersões de 0,4 µmol L⁻¹ de LSCa em soluções aquosas de HCl 5 mmol L⁻¹ e NaOH 5 mmol L⁻¹, mantidas sob agitação magnética a 25 °C até homogeneização completa. Após a reação, foi realizada a leitura da absorbância das dispersões alcalinas em comprimento de onda 250 nm em espectrofotômetro UV-Vis UV-1800 (Shimadzu, Japão), zerando-se com as respectivas soluções ácidas. A análise foi realizada em duplicata experimental, com triplicata analítica, e os resultados expressos como média de % ± DP. O cálculo do teor de hidroxilas fenólicas foi feito de acordo com a equação (1):

$$\% = (Abs_{250} \times 0,192) / C, \quad (1)$$

onde:

Abs₂₅₀ é a absorbância em 250 nm;
0,192 é o fator constante determinado pela calibração do método;
C é a concentração de lignossulfonato em µmol L⁻¹.

A determinação do teor de enxofre foi realizada como estimativa da quantidade de grupos sulfonatos, por intermédio do método de análise elementar. O experimento foi realizado em um analisador elementar Vario MicroCube (Elementar, Alemanha), utilizando 5 mg de amostra e com 70 segundos de gás oxigênio (O₂). A análise foi realizada em duplicata e os resultados expressos como média de % ± DP.

2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

2.4.1 Determinação de tamanho

O tamanho das moléculas e dos agregados moleculares, bem como seu comportamento em função da variação de concentração do polímero, foi determinado por espalhamento dinâmico de luz laser (do inglês *Dynamic Light Scattering* - DLS) e por espalhamento de raios-X em baixo ângulo (do inglês *Small-Angle X-ray Scattering* - SAXS).

O diâmetro hidrodinâmico aparente das moléculas e agregados moleculares foi realizado por DLS. O experimento foi realizado em ZetaSizer Nano ZS modelo ZEN3600 (Malvern Panalytical, Reino Unido), usando cubetas DTS1070 (Malvern Panalytical, Reino Unido), com laser a 632,8 nm, fotodetector a 12,8 ° e a 25 °C. As dispersões de LSCa de 0,3, 2,5, 25,2 e 252,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram preparadas em água purificada. As concentrações escolhidas para as análises de tamanho consideraram valores antes e após a concentração de agregação crítica (CAC) determinada paralelamente, com fatores de diluição de dez vezes, para avaliar o comportamento do polímero em condições diluídas e concentradas. Os resultados foram analisados e processados no ZetaSizer *software*. Os experimentos foram realizados em duplicata experimental, com triplicata analítica, e os resultados expressos em média do diâmetro hidrodinâmico aparente (nm) $\pm$ DP e média do índice de polidispersão (do inglês *Polydispersity Index* - Pdl) $\pm$ DP. Os gráficos de correlação foram elaborados utilizando o *software* OriginPro 8.5.

O tamanho e o comportamento de moléculas e agregados moleculares foi determinado por SAXS. Os experimentos de SAXS foram realizados na linha de luz CATERETÊ, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Brasil), utilizando uma energia fotônica de 8 keV. Os dados foram coletados com um detector Medipix (3k x 3k pixels²), em vácuo, posicionado a uma distância de 2, 10 e 28 metros da amostra, permitindo a medição de valores baixos do vetor de espalhamento.

As dispersões de LSCa de 0,03, 0,3, 3 e 30 mg mL^{-1} (0,3, 2,5, 25,2 e 252,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) foram preparadas em água purificada, sendo preenchidas em capilares de quartzo com diâmetro de 1,5 mm. O tempo de exposição à radiação foi definido experimentalmente. A temperatura do experimento foi de 25 °C para

todas as concentrações, com exceção da concentração de 30 mg mL⁻¹, que foi analisada nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, devido à melhoria na relação sinal/ruído observada nas análises gráficas. A variação de temperatura foi aplicada para avaliar a influência desta condição no comportamento do polímero.

Agregados podem exibir auto-similaridade em sua estrutura, apresentando comportamento fractal (padrões ou estruturas que se repetem em diferentes escalas) na faixa de tamanho nanométrico, o que pode ser caracterizado por meio de SAXS. A intensidade de SAXS para agregados idênticos é dada pela equação (2):

$$I = nP(q)S(q), \quad (2)$$

onde:

$P(q)$ é o fator de forma, relacionado à forma da nanopartícula;
 $S(q)$ é o fator estrutural, que considera a interferência efetiva das ondas espalhadas produzidas pelas nanopartículas que formam o agregado.

Para uma nanopartícula esférica homogênea com raio R , a intensidade de espalhamento é dada pela equação (3):

$$P(q, R) = \left(\frac{4\pi R^3}{3} \right)^2 \left[3 \frac{\sin \sin(qR) - qR \cos \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2, \quad (3)$$

Um modelo amplamente aplicado para descrever o fator estrutural de agregados fractais foi proposto por Teixeira (1986). Segundo esse modelo, o fator estrutural $S(q)$ de um agregado fractal é dado pela equação (4):

$$S(q) = 1 + \frac{1}{(qr_0)^D} \frac{D\Gamma(D-1)}{\left(1 + \frac{1}{q^2\xi^2}\right)^{(D-1)/2}} \sin \sin [(D-1) \arctan \arctan(q\xi)]. \quad (4)$$

onde:

$\Gamma(x)$ é a função gama;
 D é a dimensão fractal;
 r_0 é o raio das nanopartículas (“monômeros”) formando o agregado;
 ξ é a dimensão total do agregado.

2.4.1.1 Avaliação da influência da força iônica

Para avaliação da influência da força iônica no potencial zeta e no diâmetro hidrodinâmico aparente das estruturas poliméricas, foi realizada uma titulação de NaCl em ambiente com concentração constante do LSCa. A titulação e a medida do potencial zeta foram realizadas no equipamento Stabino Particle Charge Mapping PMX 400, com um copo cilíndrico de 10 mL e um pistão de 400 μm (Particle Metrix GmbH, Alemanha). O potencial zeta foi determinado por meio do potencial de fluxo. Foi realizada uma titulação de sal (NaCl 1 mol L⁻¹) em ambiente de LSCa 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em uma dispersão aquosa de LSCa 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sem sal até a concentração final de 100 mmol L⁻¹ de NaCl. Os dados foram adquiridos através do *software* Stabino Particle Charge.

As medidas de diâmetro hidrodinâmico aparente foram realizadas em equipamento ZetaSizer Nano ZS modelo ZEN3600 (Malvern Panalytical, Reino Unido), usando cubetas DTS1070 (Malvern Panalytical, Reino Unido), com laser a 632,8 nm, fotodetector a 12,8 ° e a 25 °C. Foram analisadas dispersões de LSCa 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contendo 10, 25, 50, 75 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl. Os resultados foram analisados e processados no ZetaSizer *software*. Os gráficos foram elaborados utilizando o *software* OriginPro 8.5.

2.4.2 Avaliação da morfologia e da formação de ambientes hidrofóbicos

A microscopia de força atômica (do inglês *Atomic Force Microscopy* - AFM) foi empregada para avaliação da morfologia, tamanho aparente e comportamento de agregação. Já a microscopia confocal de varredura a laser (do inglês *Confocal Laser Scanning Microscopy* - CLSM) foi utilizada para avaliação da formação de ambientes hidrofóbicos nos agregados.

Para as análises de AFM, 20 μL das dispersões do polímero em água purificada (2,5 e 252,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram depositadas por gotejamento em mica recém-clivada, seguido da utilização da técnica de *spin coating* (repetição do processo por três vezes) e posterior secagem a 40 °C por 12 horas em estufa. A análise foi realizada no microscópio de força atômica Agilent Scanning Probe Microscope, modelo 5500 (Keysight, EUA), utilizando *cantilever* NSC35 (Mikromasch, EUA), com frequência de ressonância de aproximadamente 200 KHz e

uma força constante de 10 N m^{-1} , no modo de contato intermitente (*tapping*). As imagens de topografia foram adquiridas por intermédio do *software* Picoview 14.4 e o pós-tratamento dos dados foi realizado no *software* Gwyddion 2.63.

Já para as análises de CLSM, dispersões aquosas do LSCa foram preparadas em concentrações inferiores e superiores à concentração de agregação crítica (CAC), 25,2 e 252,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, contendo também vermelho do Nilo (15 ppm). Após 12 horas, as amostras foram dispostas em placa de microscopia confocal e avaliadas no microscópio confocal de varredura a laser A1R MP+ (Nikon, Japão). Foram utilizados detectores 525/50 (500-550 nm) e 595/50 (570-620 nm). As imagens foram obtidas num aumento de 60x e processadas no *software* Image J.

2.4.3 Avaliação das propriedades tensoativas

As análises de tensiometria foram realizadas para determinar o comportamento e parâmetros de superfície do LSCa. Para isso, os experimentos foram conduzidos em tensiômetro Contact Angle System OCA 15 (Dataphysics Instruments GmbH, Alemanha), utilizando seringa de 500 μL (Hamilton, EUA), com agulha com diâmetro externo de 0,91 mm e comprimento de 38,10 mm. O processamento dos dados foi realizado em *software* SCA20. O método empregado foi o de gota pendente, que compreende a determinação do formato da gota, seguido pelo ajuste para a equação de Young-Laplace. As análises foram realizadas a 20 °C na interface água/ar (293,15 K), usando dispersões de LSCa de 2,1 a 1261,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água purificada. O tempo de análise de gota pendente foi definido experimentalmente e fixado em 90 segundos. O volume da gota foi ajustado de acordo com a iminência da queda. A tensão superficial para cada ponto compreendeu análise em triplicata experimental e quintuplicata analítica. Os resultados foram expressos como média da tensão superficial (mN m^{-1}) $\pm$ DP e os gráficos foram elaborados utilizando o *software* OriginPro 8.5.

Baseado nos dados de tensão superficial, as isotermas de Gibbs foram construídas e o valor da concentração de agregação crítica (CAC) foi calculado a partir da intersecção das tendências lineares em baixas e altas concentrações, usando um método de regressão linear. A partir dessas tendências, foi possível realizar o cálculo da concentração de excesso superficial (Γ), da área mínima de

superfície ocupada por molécula (A_{min}) e da pressão superficial (π) de acordo com as equações (5), (6) e (7) descritas abaixo (Hiemenz; Rajagopalan, 2016):

$$\Gamma = \frac{-1}{2RT} \cdot \left(\frac{d\gamma}{d\ln C} \right), \quad (5)$$

onde:

Γ é a concentração de excesso superficial (mol m^{-2});

R é a Constante Universal dos Gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);

T é a temperatura (K);

a razão $\frac{d\gamma}{d\ln C}$ é a inclinação da tendência linear na faixa de baixas concentrações na isoterma de Gibbs.

$$A_{min} = \frac{1}{\Gamma \cdot N_A}, \quad (6)$$

onde:

A_{min} é a área mínima ocupada por molécula na interface ($\text{\AA}^2 \text{ molécula}^{-1}$);

N_A é o número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas mol}^{-1}$).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_{min} \quad (7)$$

onde:

γ_0 é a tensão superficial da água purificada;

γ_{min} é a tensão superficial mínima da dispersão contendo o adsorvato.

2.4.4 Determinação de parâmetros físico-químicos e termodinâmicos

A titulação condutimétrica foi conduzida para determinar parâmetros físico-químicos e termodinâmicos de agregação, objetivando compreender melhor o comportamento de agregação, de acordo com a metodologia descrita por Seixas-Júnior *et al.* (2020). Os aspectos variados foram a temperatura, concentração do polímero e força iônica. As titulações foram realizadas manualmente, com agitação magnética constante e controle de temperatura em 20, 25, 30 e 35 °C (293,15; 298,15; 303,15 e 308,15 K, respectivamente) em banho TC-500 (AMETEK Brookfield, EUA). As medições de condutividade foram conduzidas em

condutivímetro C708 (ANALION, Brasil). Uma dispersão aquosa saturada de LSCa ($1261,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi titulada em água ultrapurificada, com e sem a influência de força iônica constante (NaCl 100 mmol L^{-1}). Para a leitura da condutividade, a agitação foi interrompida após homogeneização, e os valores foram coletados após a estabilização do sistema.

As isotermas foram elaboradas em *software* OriginPro 8.5 e a CAC foi calculada a partir da intersecção das tendências lineares em região de baixa e alta concentração de LSCa, quando há mudança da inclinação da curva. Essas duas tendências lineares, uma na primeira inclinação da curva, antes da CAC, e a outra na segunda inclinação da curva, depois da CAC, possuem coeficientes angulares, S_1 e S_2 , respectivamente. Esses fatores são necessários para o cálculo do grau de ionização (α). Este parâmetro está relacionado com o conteúdo de contra-íons na superfície da micela (agregado) e com a densidade de carga, relativo às propriedades físico-químicas da interface micelar, e sua determinação está representada na equação (8):

$$\alpha = \frac{S_2}{S_1}, \quad (8)$$

onde:

α é o grau de ionização do surfactante;
 S_1 e S_2 são os coeficientes angulares derivados das duas tendências lineares da curva proveniente da titulação condutimétrica.

Os demais parâmetros termodinâmicos foram determinados de acordo com as equações (9), (10) e (11) dispostas abaixo:

$$\Delta G = (2 - \alpha) \cdot RT \cdot \ln(X), \quad (9)$$

onde:

ΔG é a variação da energia livre de Gibbs (J mol^{-1});
 α é o grau de ionização do surfactante;
 R é a Constante Universal dos Gases ($8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);
 T é a temperatura (K);
 X é a fração molar.

$$\Delta H = - (2 - \alpha) \cdot (RT^2) \cdot \left(\frac{\Delta \ln X}{\Delta T} \right), \quad (10)$$

onde:

ΔH é a variação de entalpia (J mol^{-1});
 α é o grau de ionização do surfactante;
 R é a Constante Universal dos Gases ($8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);
 T é a temperatura (K);
a razão $\frac{\Delta \ln X}{\Delta T}$ é o coeficiente angular da tendência linear no gráfico $\ln X$ CAC em função da temperatura.

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}, \quad (11)$$

onde:

ΔS é a variação de entropia ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);
 ΔH é a variação de entalpia (J mol^{-1});
 ΔG é a variação da energia livre de Gibbs (J mol^{-1});
 T é a temperatura (K).

Análises adicionais foram realizadas utilizando calorimetria de titulação isotérmica, um método considerado padrão-ouro para a determinação de parâmetros termodinâmicos em interações moleculares. Os testes foram feitos a partir da titulação de uma dispersão aquosa saturada de LSCa ($1261,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) em água ultrapurificada, usando a mesma variação de temperatura aplicada na titulação condutimétrica - 20, 25, 30 e 35 °C (293,15; 298,15; 303,15 e 308,15 K, respectivamente). O equipamento empregado foi o MicroCal iTC 200 (Malvern Panalytical, Reino Unido), com *software* MicroCal Analysis Launcher. Os parâmetros utilizados foram: injeção inicial de 0,5 μL com 19 injeções subsequentes de 2,0 μL ; 180 segundos de estabilização com atraso inicial de 60 segundos; agitação de 750 rpm; e potência de referência de 5 $\mu\text{J s}^{-1}$. No entanto, apesar da sensibilidade do método, as curvas originadas foram insatisfatórias devido a uma limitação volumétrica do equipamento e à impossibilidade de integração das curvas independentes. Dessa forma, os resultados não serão exibidos neste trabalho.

2.4.5 Determinação do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico

A determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) foi realizado pelo método direto, em que se compara visualmente o comportamento das emulsões

com padrões de EHL conhecidos, de acordo com Prista, Alves e Morgado (1973, 1975). A composição complexa e a coloração do lignossulfonato não permitiram a aplicação do método indireto, por turbidimetria, nem do método teórico. Dessa maneira, foi preparada uma série de emulsões a partir de dois componentes com EHL conhecidos - Span[®] 80 (emulsionante padrão), EHL 4,3; e óleo mineral/vaselina líquida, EHL 10. As emulsões foram formuladas com diferentes proporções entre os emulsionantes utilizados como padrão e o LSCa, mantendo-se um conteúdo total de 5% de agentes emulsificantes na composição. A fase oleosa teve concentração constante. A técnica de emulsificação foi definida experimentalmente e padronizada em agitador de tubos Vórtex, por 90 segundos. A medida do EHL da emulsão mais estável após 24 horas será igual ao EHL do emulsionante problema, de acordo com a equação (12) representada abaixo:

$$EHL = [EHL \text{ do óleo} - (EHL \text{ do emulsionante padrão} \times P)] \div N \quad (12)$$

onde:

P é a % do emulsionante padrão;

N é a % do emulsionante problema.

2.5 AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS APLICAÇÕES

2.5.1 Determinação da atividade de bloqueio ultravioleta

Para a determinação da atividade de bloqueio ultravioleta (UV) preliminar, as amostras de LSCa foram preparadas em concentrações de 0,3, 2,5, 25,2 e 252,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água purificada e submetidas à agitação magnética até homogeneização. Em seguida, as amostras foram analisadas no modo de transmitância em espectrofotômetro UV-Vis UV-1800 (Shimadzu, Japão), na região do UV e da luz visível com varredura de 800 a 190 nm, com destaque para a região do UV A e UV B (400 a 290 nm). Os gráficos foram elaborados utilizando o *software* OriginPro 8.5.

2.5.2 Avaliação de propriedades antimicrobianas

A suscetibilidade dos microrganismos *Escherichia coli* (cepa ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 6538), e *Candida albicans* (cepa ATCC 10231) ao LSCa foi analisada pelo método de microdiluição em caldo, conforme previsto pelas normas da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI/NCCLS): M7-A6 para bactérias e M27-A2 para leveduras (CLSI, 2017, 2024). As cepas indicadas, assim como os demais reagentes necessários para o desenvolvimento dos testes, pertencem à coleção do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico do Departamento de Farmácia da UFPR.

As bactérias *E. coli* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva) foram previamente cultivadas em ágar Mueller-Hinton (MH) por 24 horas em estufa a 35 °C. A levedura *C. albicans* foi previamente cultivada em ágar Saboraud por 24 horas em estufa a 35 °C. Todos os procedimentos seguintes utilizaram ágar/caldo MH para as bactérias e ágar/caldo Saboraud para a levedura. Em todos os experimentos, as amostras foram previamente esterilizadas por autoclavagem, por um período de 30 minutos, a 121 °C.

Para o teste, foram utilizadas microplacas de 96 poços contendo 100 µL da amostra previamente diluída por diluição seriada, em 100 µL de meio caldo adequado ao microrganismo. A concentração inicial de LSCa foi de 420,5 µmol L⁻¹, correspondente a uma concentração superior à CAC após a primeira diluição. Em seguida, 10 µL de inóculo microbiano recém preparado em concentrações específicas foi adicionado em todos os poços, a fim de se obter as concentrações finais de 1,5 x 10⁶ UFC mL⁻¹ para as bactérias e para a levedura. Os inóculos microbianos tiveram sua concentração determinada por método turbidimétrico por intermédio da escala McFarland. As microplacas foram incubadas a 35 °C por cerca de 22 horas.

A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras foi realizada de forma visual para a levedura (turvação do meio e presença de colônias) e complementada pela adição de 20 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (1,25 mg mL⁻¹) para as bactérias. Após a adição, as amostras foram incubadas por 2 horas. A presença de crescimento microbiano foi indicada pela mudança de cor para rosa. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento microbiano visível. O mesmo procedimento foi realizado para

os controles positivos: cloranfenicol ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) para *E. coli* e *S. aureus*, e cetoconazol ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) para a *C. albicans*. O controle negativo (água destilada autoclavada) foi tratado da mesma forma, seguindo a mesma metodologia. Todas as análises foram realizadas em triplicata analítica.

Em seguida, foram realizados ensaios para determinar as atividades bactericidas/bacteriostáticas ou fungicidas/fungistáticas da amostra. Placas de Petri foram preparadas com ágar adequado ao microrganismo. Após a solidificação dos meios, as placas foram divididas em três partes iguais, e $10 \mu\text{L}$ das amostras das microplacas de 96 poços (contendo meio de cultura, microrganismo e LSCa) foram depositados no centro de cada divisão e semeados por técnica de esgotamento por estria simples. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 35°C .

2.5.3 Avaliação do potencial de defesa contra *Botrytis cinerea* em *Vitis vinifera* L.

A cepa VvBcSP21-B1 de *Botrytis cinerea*, assim como os demais reagentes necessários para o desenvolvimento dos testes, foram obtidos da coleção do Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID) do Departamento de Fitotecnia da UFPR. As uvas Thompson (*Vitis vinifera* L. “*Thompson Seedless*”) foram adquiridas em um mercado local (Curitiba, Brasil). Os experimentos foram realizados na safra de 2024, utilizando uvas Thompson saudáveis. Os frutos sadios incluídos no ensaio foram aqueles sem contaminação microbiológica aparente e sem cortes ou rupturas em suas cascas.

2.5.3.1 Ensaio *in vitro* de crescimento micelial do patógeno *Botrytis cinerea*

O ensaio *in vitro* de crescimento micelial do fungo patogênico *Botrytis cinerea* foi conduzido para comprovar a atividade das cepas do fungo e a sua capacidade de esporulação, para posterior utilização no teste *ex vivo* (Albertin *et al.*, 2024).

Inicialmente, o cultivo do *Botrytis cinerea* foi realizado em placas de Petri contendo meio BDA (ágar batata dextrose). As placas foram inseridas na incubadora BOD (do inglês *Biochemical Oxygen Demand*) por 2 dias, com uma temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. No terceiro dia de crescimento, as placas foram colocadas em BOD com luz negra a 30°C , para estimular a esporulação do fungo.

Decorridos 10-15 dias, as placas foram utilizadas para preparar uma suspensão de conídios calibrada a $1,0 \times 10^5$ conídios mL⁻¹.

Posteriormente, foi realizado um ensaio preliminar em uma microplaca de 96 poços para comprovar que as amostras não estavam contaminadas. Para isso, foi inserido o tratamento (água purificada estéril, fungicida e LSCa) e a suspensão de conídios na proporção 1:1.

Em placas de Petri contendo meio BDA, quatro discos de papel filtro esterilizados, com 8 mm de diâmetro, foram depositados em pontos equidistantes nas extremidades das placas. Cada disco de papel recebeu 10 µL de amostra testada anteriormente (LSCa e patógeno; fungicida e patógeno; água purificada estéril e patógeno). A concentração final de LSCa na mistura com a suspensão de conídios foi de 210,3 µmol L⁻¹ e o fungicida mancozeb foi aplicado na concentração final de 50 µg mL⁻¹. A testemunha foi definida como a placa com tratamento de água purificada estéril. As placas foram incubadas em BOD a 22 °C por 5 dias e fotoperíodo de 12 horas. O ensaio foi realizado em quadruplicata analítica. Na avaliação do crescimento micelial, dois diâmetros perpendiculares e opostos das colônias foram medidos.

2.5.3.2 Ensaio *ex vivo* em frutos para inibição do patógeno *Botrytis cinerea*

O patógeno *Botrytis cinerea* foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA por 2 dias, utilizando BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. No terceiro dia de crescimento, as placas foram colocadas em BOD com luz negra à 30 °C, para estimular a esporulação do fungo. Após 10-15 dias, as placas foram utilizadas para preparar uma suspensão de conídios calibrada a $1,0 \times 10^5$ conídios mL⁻¹ (Albertin *et al.*, 2024).

Para os ensaios *ex vivo*, foram utilizadas uvas Thompson (*Vitis vinifera* L. “Thompson Seedless”). Esses frutos foram previamente higienizados por imersão (um minuto) em etanol (70,0% v v⁻¹), hipoclorito de sódio (1,0% v v⁻¹) e água purificada (3 vezes) e, em seguida, submetidos à secagem a 25 °C.

Os frutos foram tratados com água purificada estéril (controle negativo), com a dispersão de LSCa em água purificada estéril na concentração de 420,5 µmol L⁻¹ e com o fungicida mancozeb na concentração recomendada para aplicação em campo (50,0 µg mL⁻¹) (controle positivo). As bagas de uva foram imersas em cada

tratamento por 30 segundos e secas por 2 horas. Para simular a condição de campo, suco da baga de uva foi preparado e adicionado à suspensão de conídios do *Botrytis cinerea*. Em seguida, cada baga de uva foi inoculada com 10 µL da suspensão de conídios do fungo ($1,0 \times 10^5$ conídios mL⁻¹) em suco de uva. Posteriormente, as amostras foram colocadas em caixa plástica especialmente projetada para a germinação de sementes (Gerbox) na presença de um ambiente úmido, proporcionado pelo papel de filtro umedecido com água purificada estéril. Por fim, os frutos foram incubados em BOD a 22 °C utilizando um fotoperíodo de 12 horas. Três repetições com cinco bagas de uva em cada Gerbox foram realizadas para cada tratamento e as avaliações dos sintomas foram realizadas a cada 2 dias durante 6 dias.

2.5.4 Determinação da citotoxicidade

Para a determinação da citotoxicidade do LSCa, foi realizado o teste de captura de vermelho neutro (NRU - do inglês *Neutral Red Uptake*), frente às células L929 (Ates *et al.*, 2017; ISO, 2009).

Inicialmente, as células (1×10^4) foram plaqueadas em microplaca de 96 poços e mantidas em cultura por 24 horas para adesão à placa, formando uma monocamada semi-confluyente. Após esse tempo, o meio foi removido e as células foram expostas ao tratamento teste (LSCa) em diferentes concentrações finais (12,5 - 200,0 µg mL⁻¹), adicionando 100 µL de meio com o respectivo tratamento. Inserido o tratamento, as células foram incubadas por 24 horas. Meio DMEM foi utilizado como veículo. Todas as incubações foram realizadas em temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ e umidade de 95%.

Decorrido o tempo do tratamento, foi realizada uma avaliação da morfologia celular por microscopia. Em seguida, os meios de cultivo foram removidos e as células foram lavadas com PBS pré-aquecido. Na sequência, foram adicionados 100 µL da solução de vermelho neutro (50 µg mL⁻¹) em cada poço e incubou-se por 3 horas. Após esse tempo, a solução de vermelho neutro foi removida e as células foram lavadas com PBS. Foram adicionados 100 µL de uma solução de 50% etanol/1% ácido acético e a placa foi deixada em agitação até todo o vermelho neutro ser extraído das células e formar uma solução homogênea (10 minutos). Por fim, a absorbância foi lida a 540 nm em leitor de microplacas.

A porcentagem de viabilidade celular relativa foi calculada utilizando como 100% a viabilidade das células sem tratamento (branco), apenas com meio, caracterizando o controle negativo (C-). A coloração do LSCa foi descontada dos valores de absorbância. A citotoxicidade das células tratadas foi determinada através da redução da viabilidade celular (captura de vermelho neutro pelas células vivas) em relação ao branco. O ensaio foi realizado em duplicata experimental e triplicata analítica. A análise estatística dos resultados pertinentes foi feita utilizando o software Minitab® 19.1, aplicando ANOVA de um fator com o pós-teste de Tukey. Os resultados foram representados na forma de média da % de viabilidade celular $\pm$ DP. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PURIFICAÇÃO DO LIGNOSSULFONATO DE CÁLCIO

A purificação do LSCa foi realizada, obtendo rendimento de 14,4% (m m^{-1}). Não foram encontrados relatos na literatura acerca da purificação de lignossulfonato de cálcio e possíveis rendimentos do processo. A etapa foi aplicada devido à presença de alto teor de contaminantes como polissacarídeos e produtos químicos inorgânicos da polpação sulfito (Alwadani; Fatehi, 2018). Além disso, a presença de contaminantes, como carboidratos simples e microrganismos (Liu *et al.*, 2018), pode estar associada à origem da biomassa e ao fato de o produto ser tratado como resíduo.

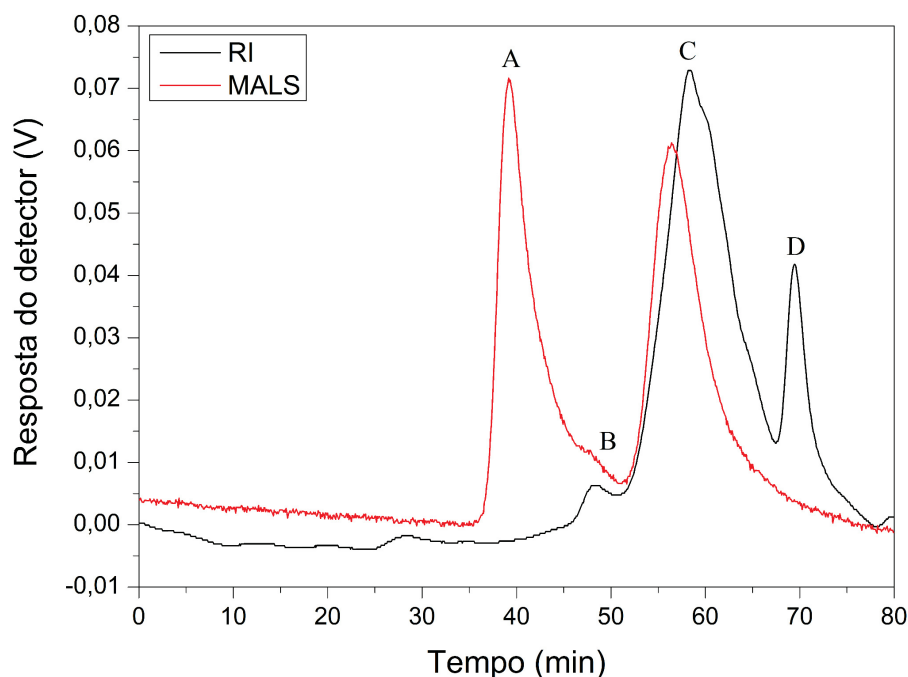
3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

3.2.1 Determinação da massa molar

O perfil de eluição representado na Figura 8 para o LSCa referente ao detector RI mostra três picos proeminentes: o primeiro próximo a 50 minutos, que sugere a presença de frações de maior massa molar de lignossulfonato (B); o segundo característico da amostra de lignossulfonato, presente em cerca de 60 minutos (C); e o terceiro representando o volume total da coluna, ou seja, frações de baixa massa molar que não foram fracionados através da cromatografia de exclusão

por tamanho, em cerca de 70 minutos (D). Utilizando o detector MALS foi possível observar dois picos, um em cerca de 40 minutos (A), representando agregados de alta massa molar, e outro coincidindo com o pico observado na análise por RI, em 60 minutos (C), próprio da amostra.

FIGURA 8 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA AMOSTRA DE LSCa UTILIZANDO A TÉCNICA DE SEC ACOPLADA A DETECTORES MALS A 90 ° E RI



FONTE: A autora (2025).

A massa molar média ponderada (M_w) obtida por essa técnica foi de $1,19 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, enquanto a massa molar média numérica (M_n) foi de $0,94 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ e a massa molar média Z (M_z) foi de $1,52 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. Para obtenção desses valores, o *software* utilizou padrões de massa molar conhecida (como o óxido de polietileno) para construir a curva de calibração, a partir da qual calculou a massa molar da amostra por meio da integração dos picos obtidos no cromatograma. O valor mais representativo para essa amostra, nesse caso, é o de M_w . A dispersão ($\mathcal{D}$: M_w/M_n) foi de $1,260 \pm 0,054$, caracterizando uma amostra polidispersa, com polidispersão semelhante às encontradas por Fredheim, Braaten e Christensen (2002) para determinadas frações de lignossulfonato. Constatou-se, também, a presença de agregados de maior massa molar, com M_w de $3,73 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

As ligninas e os lignossulfonatos podem possuir uma massa molar bastante variável, já que a fonte da biomassa, a forma de extração e as condições ambientais podem influenciar no tamanho da cadeia polimérica. Fredheim, Braaten e

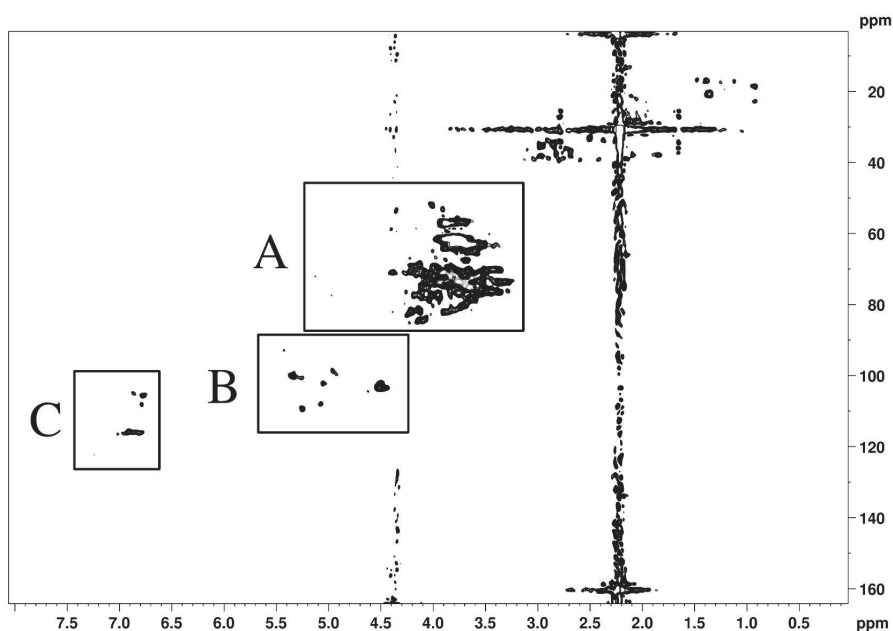
Christensen (2002) obtiveram valores de M_w que variaram de $4,60 \times 10^3$ até $3,98 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ para o lignossulfonato, comprovando esse aspecto heterogêneo e polidisperso do polímero. Musl e colaboradores (2021) encontraram valores mais baixos de M_w , de $3,67 \times 10^3$ a $6,44 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$, assim como Ouyang e colaboradores (2011), que encontraram valores de $4,70 \times 10^3$ a $4,02 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$. Zinovyev e colaboradores (2018) obtiveram M_w de $3,30 \times 10^4$ a $5,50 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ para lignossulfonatos de sódio, magnésio e amônio. Hong e Qiu (2020) encontraram um valor de M_w de $1,52 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ para uma determinada fração de lignossulfonato, o que está próximo ao encontrado para o LSCa neste estudo. Por fim, trabalhos anteriores do grupo, não publicados, constataram um valor de M_w de $1,03 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ para o lignossulfonato de cálcio da mesma fonte, porém, de lote distinto. Em vista do discutido, o valor de M_w encontrado para o LSCa nessa seção está de acordo com o descrito em literatura.

3.2.2 Caracterização estrutural e funcional

O LSCa foi analisado por RMN de HSQC (δ_C/δ_H 0.0–165.0/0.0–8.0 ppm) a fim de confirmar a presença de lignossulfonato e identificar o tipo de lignina presente nessas amostras, que podem ser do tipo guaiacila ou siringila-guaiacila, de acordo com os monômeros representados esquematicamente na Figura 10. A correlação entre as interações C-H e os deslocamentos químicos foram assinalados de acordo com a literatura (Lutnaes *et al.*, 2008; Savy *et al.*, 2018; Suota *et al.*, 2021).

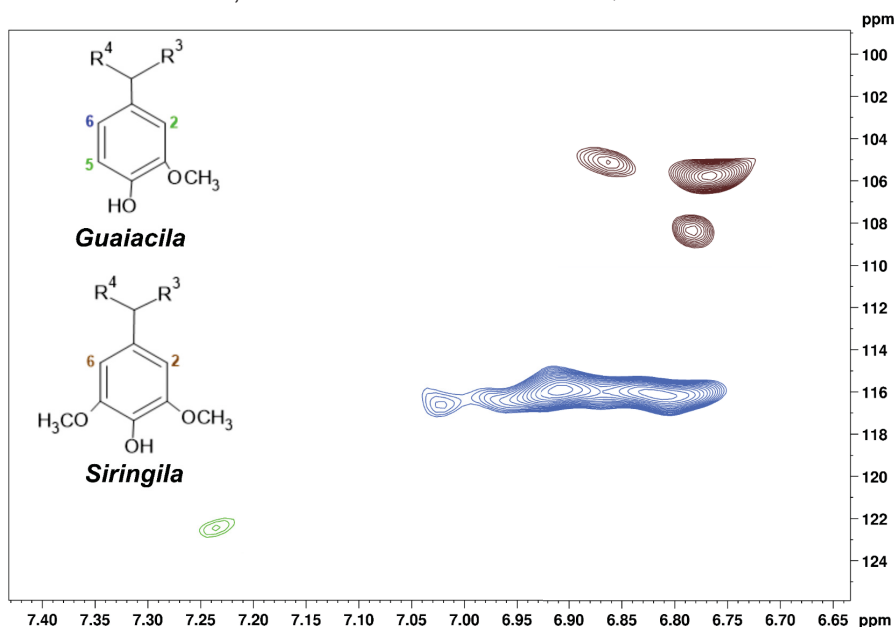
A Figura 9 possibilita a observação de três regiões, A, B e C, referentes a estruturas características da amostra de LSCa. A região A (δ_C/δ_H 50.0–90.0/3.0–5.3 ppm) representa a região de correlações C-H de cadeia alquílica, C-H do anel dos carboidratos e C-H dos grupos metoxila. Já a região B (δ_C/δ_H 90.0–115.0/4.3–5.6 ppm) representa a região correspondente a C-1/H-1 (carbono anomérico) dos carboidratos. Por fim, a região C (δ_C/δ_H 100.0–125.0/6.6–7.5 ppm) representa a região de deslocamento químico de C-H do anel aromático.

FIGURA 9 – ESPECTRO BIDIMENSIONAL DE HSQC (^{13}C - ^1H), RESOLVIDO E APROXIMADO PARA LSCa EM D_2O , A 70 °C E EM 400,13 MHz. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM (δ)



FONTE: A autora (2025).

FIGURA 10 – ESQUEMA DA REGIÃO DO ANEL AROMÁTICO (C) COM BASE NO ESPECTRO BIDIMENSIONAL HSQC (^{13}C - ^1H) RESOLVIDO E APROXIMADO PARA LSCa, EM D_2O , A 70 °C E EM 400,13 MHz. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM (δ)



FONTE: A autora (2025).

Os sinais proeminentes na região B, dos carbonos anoméricos dos carboidratos, sugere um teor de carboidratos considerável, quando comparado a outros tipos de lignossulfonato. É comum a presença de carboidratos em amostras

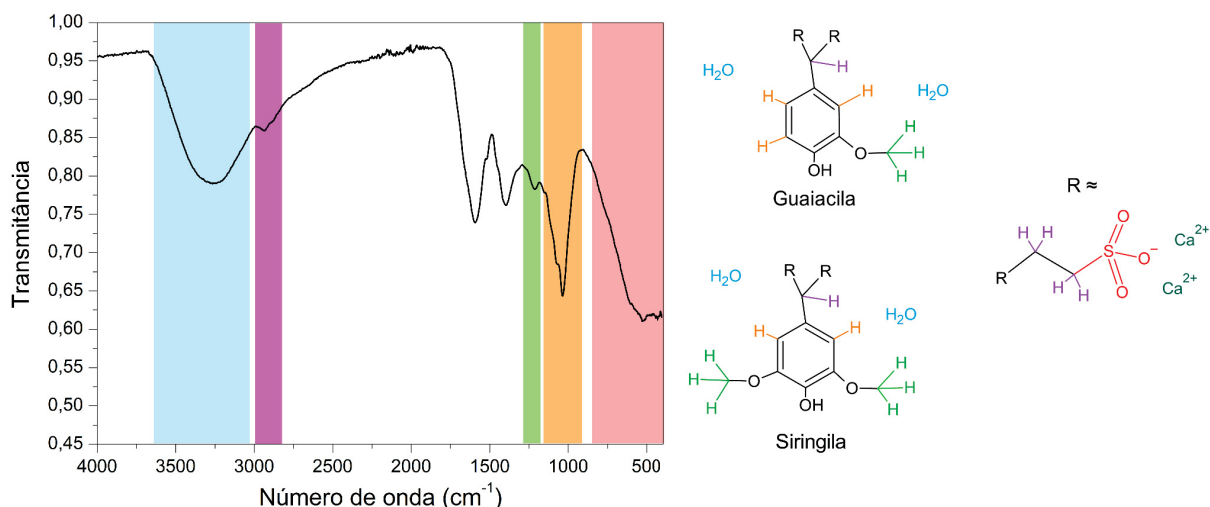
dessa natureza, especialmente de hemiceluloses; em amostras comerciais, por exemplo, já foi constatado até 55% de carboidratos (Musl *et al.*, 2021).

A Figura 10 é uma ampliação da região C presente na Figura 9, onde é possível observar as correlações da região do anel aromático. O deslocamento químico de 121,64-122,84/7,22-7,25 ppm foi atribuído ao C-2/H-2 e ao C-5/H-5 do monômero guaiacila (em verde), além das correlações em 114,80-117,10/6,76-7,04 ppm, correspondentes ao C-6/H-6 da mesma subunidade (em azul). Ainda, a amostra apresentou correlações em 104,31-109,00/6,72-6,89 ppm, que sugerem uma correspondência com o C-2/H-2 e o C-6/H-6 das unidades siringila (em marrom) (Lutnaes *et al.*, 2008; Savy *et al.*, 2018; Suota *et al.*, 2021).

Em vista do apresentado, os resultados de RMN sugerem que a amostra LSCa contém ligninas do tipo siringila-guaiacila. Portanto, sugere-se, aqui, que o lignossulfonato dessa amostra é proveniente de biomassa de folhosas (*hardwood* - madeira “dura”), devido à sua composição de ligninas, como também foi observado por Ayuso-Fernández e colaboradores (2019).

Na Figura 11 é possível observar bandas características de grupos funcionais presentes na estrutura de lignossulfonatos. Mais detalhadamente, a banda em 3254 cm^{-1} (azul) representa a deformação axial de O-H de hidroxilas livres; a banda em 2930 cm^{-1} (amarelo) é atribuída à deformação axial de C-H de alcanos; as bandas em 1200-1397 cm^{-1} (verde) são características de deformação assimétrica de C-H dos grupos metoxila; a banda em 1038 cm^{-1} (laranja) representa a deformação da ligação C-H do anel aromático (siringila e guaiacila); por fim, as bandas em 500-650 cm^{-1} (vermelho) sugerem vibrações de deformação axial de C-S e alongamento de ligações S-O, ambas características de grupo sulfonato. As bandas localizadas em 1500-1600 cm^{-1} podem estar relacionadas ao estiramento C=C em anéis aromáticos. Portanto, os dados são característicos de lignossulfonatos e estão de acordo com o que foi relatado na literatura (Savy *et al.*, 2018; Faix, 1992; Gao *et al.*, 2020; Lugovitskaya; Kolmachikhina, 2021; Bahrpaima; Fatehi, 2018).

FIGURA 11 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER PARA A AMOSTRA DE LSCa, COM REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRUPOS FUNCIONAIS



FONTE: A autora (2025).

NOTA: As faixas coloridas de número de onda estão pintadas em cor correspondente às ligações químicas dos grupos funcionais apresentados ao lado do espectro.

3.2.3 Quantificação de grupos funcionais e teor de enxofre

Os valores percentuais aparentes dos teores de carboxilas, hidroxilas fenólicas e conteúdo de enxofre estão indicados na Tabela 1. O teor de enxofre representa proporcionalmente o teor de grupos sulfonatos, ou sulfatos livres. Alguns autores observaram que, em geral, as amostras de lignossulfonato possuem cerca de 2,6-6,6% de carboxilas, 1,5-2,3% de hidroxilas fenólicas e 3,0-8,0% de conteúdo de enxofre (Chique *et al.*, 2023; Lugovitskaya; Rogozhnikov, 2023; Carrasco *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2010; Aro; Fatehi, 2017; Hong; Qiu, 2020). Faz-se importante a determinação dos teores de grupos funcionais já que a composição química influencia em suas propriedades físico-químicas. Neste trabalho, foram obtidos teores de carboxilas, hidroxilas fenólicas e conteúdo de enxofre ligeiramente diferentes aos relatados por outros autores, fato que pode estar relacionado ao caráter heterogêneo do material.

TABELA 1 – QUANTIFICAÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS PARA O LSCa

Grupo funcional/elemento	Teor $\pm$ DP (%)
Carboxilas	0,53 $\pm$ 0,13
Hidroxilas fenólicas	0,52 $\pm$ 0,05
Enxofre	1,29 $\pm$ 0,00

FONTE: A autora (2025).

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

3.3.1 Determinação de tamanho

As medidas de diâmetro hidrodinâmico aparente para as diferentes concentrações de LSCa estão apresentadas na Tabela 2, e as respectivas correlações, na Figura 12. A representação dos correlogramas (Figura 12) é importante pois imprime a qualidade da análise realizada e pode trazer informações sobre a dinâmica de partículas na amostra. Um decaimento complexo das curvas ou com múltiplos componentes sugere, por exemplo, uma amostra polidispersa ou com múltiplas populações. Com relação à Tabela 2, os valores observados para as três primeiras concentrações foram semelhantes (em torno de 414 nm), indicando que a população predominante de agregados permanece consistente mesmo com variações de concentração. Vale ressaltar que, neste caso, as análises por espalhamento de luz dinâmico foram conduzidas de maneira comparativa, uma vez que a lignina e seus derivados apresentam absorção significativa na faixa de emissão do laser utilizado, fato observado por análises prévias de absorbância (varredura) na região do UV e da luz visível. Ainda assim, o método permitiu uma caracterização eficiente do sistema, mesmo considerando fatores como a alta polidispersão dos agregados (indicada pelos valores de Pdl) e a sensibilidade da técnica na detecção de nanoestruturas menores. Esses aspectos reforçam a complexidade da dispersão formada.

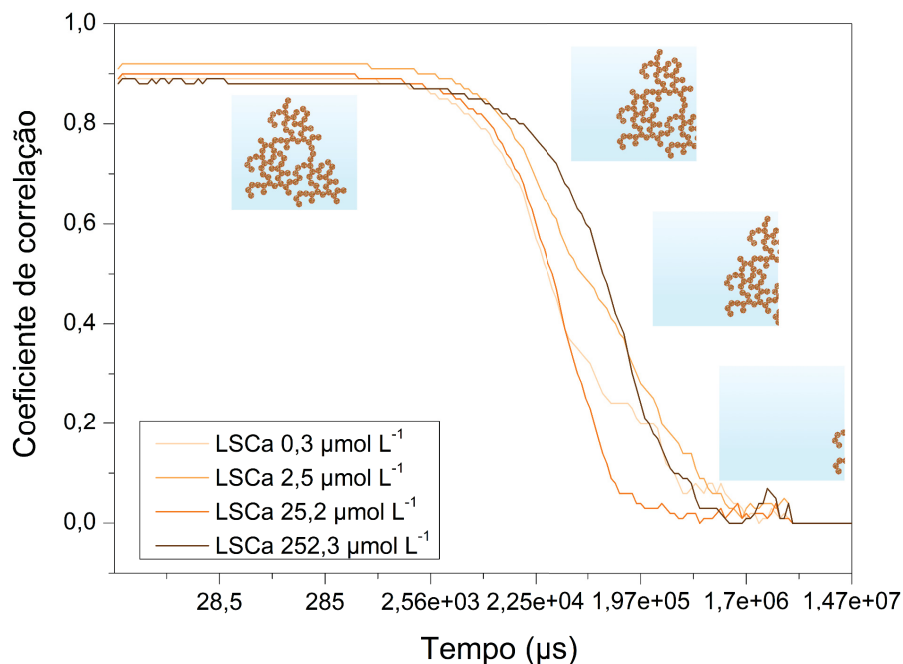
TABELA 2 – REPRESENTAÇÃO DA MÉDIA PONDERADA DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE DO LSCa, JUNTO AO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (Pdl) E SEUS RESPECTIVOS DPs

[LSCa] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Média ponderada de tamanho $\pm$ DP (d.nm)	Pdl $\pm$ DP
0,3	403 ± 175	$0,170 \pm 0,113$
2,5	391 ± 30	$0,572 \pm 0,605$
25,2*	$447 \pm 76^*$	$1,000 \pm 0,000^*$
252,3*	$602 \pm 5^*$	$0,950 \pm 0,071^*$

FONTE: A autora (2025).

NOTA: *As limitações metodológicas comprometem a confiabilidade completa dos dados gerados nessa concentração de LSCa.

FIGURA 12 – ANÁLISES DE CORRELAÇÃO REPRESENTATIVAS PARA CADA CONCENTRAÇÃO DE LSCa EM DISPERSÃO AQUOSA, COM REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA JANELA DE CORRELAÇÃO



FONTE: A autora (2025).

As análises de SAXS foram realizadas para caracterizar os tamanhos do LSCa de maneira mais adequada, superando possíveis limitações associadas a técnicas baseadas em luz visível. Além disso, buscaram fornecer esclarecimentos mais detalhados sobre a estrutura e a morfologia dos componentes do LSCa em dispersão. Para cada análise - seja na avaliação da contribuição de diferentes morfologias, seja na investigação da influência da concentração e da temperatura - foi realizado um ajuste gráfico e matemático específico. Dessa forma, os resultados

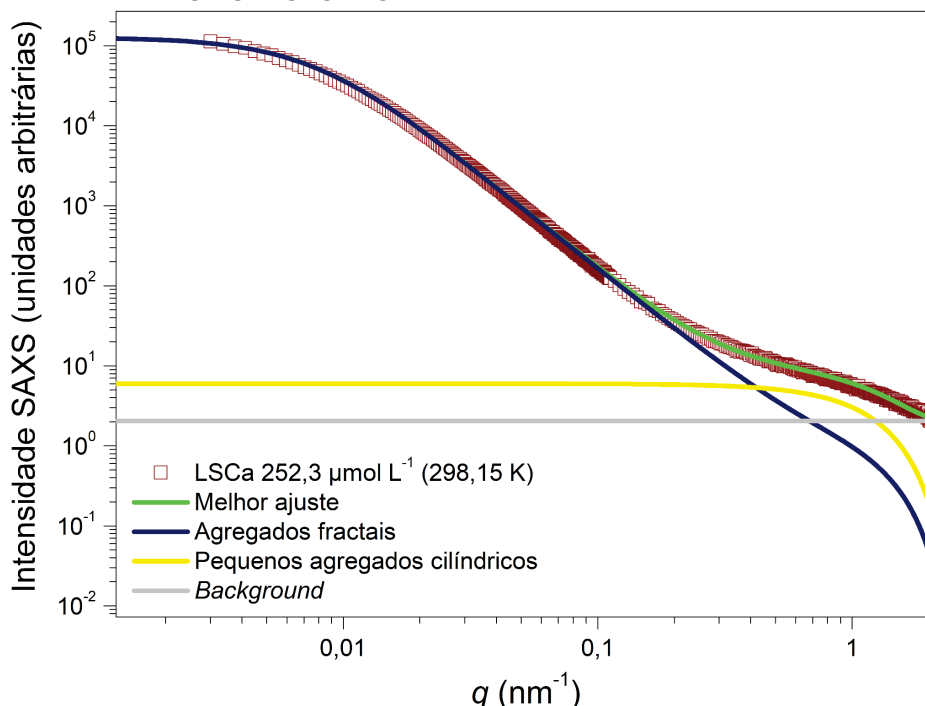
obtidos a partir de cada ajuste, como os valores de diâmetro, podem apresentar pequenas variações, embora permaneçam próximos entre si.

A Figura 13 mostra o logaritmo da intensidade de SAXS $\log(I)$ para o LSCa em dispersão ($30,0 \text{ mg mL}^{-1}/252,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em função do logaritmo do módulo do vetor de dispersão $\log(q)$. Nessa análise, observa-se um comportamento linear em uma ampla faixa de q (aproximadamente $0,01\text{--}0,20 \text{ nm}^{-1}$) no gráfico $\log(I)$ vs. $\log(q)$, com uma inclinação de $-2,45$. Para $q < 0,01 \text{ nm}^{-1}$, a inclinação diminui à medida que q diminui. Esse comportamento é consistente com a dispersão produzida por agregados com estrutura fractal, indicando uma dimensão fractal $D = 2,45$ e um diâmetro médio de agregado de cerca de 240 nm .

De acordo com as equações (2)–(4), espera-se uma inclinação de -4 para grandes valores de q no gráfico $\log(I)$ vs. $\log(q)$, onde a lei de Porod é aplicável (Glatter; Kratky, 1982). Assim, a inclinação deveria transitar de $-D$ para -4 com o aumento dos valores de q além da faixa onde o gráfico mostra um comportamento linear. No entanto, para $q > 0,2 \text{ nm}^{-1}$, observa-se um aumento na inclinação. Para explicar esse comportamento em valores de q mais altos, consideramos a presença de uma contribuição adicional de dispersão proveniente de agregados menores em forma de bastão.

Na Figura 13, é possível observar separadamente as contribuições dos grandes agregados fractais (curva azul) e dos agregados menores em forma de bastão (curva amarela) obtidas pela análise de melhor ajuste, assumindo que a intensidade total de SAXS é a soma da dispersão de ambos os tipos de partículas (curva verde, correspondente ao ajuste dos pontos em vermelho escuro). A intensidade total de dispersão, mostrada pela curva em vermelho escuro, é a soma dessas duas contribuições. A Tabela 3 resume os valores dos parâmetros ajustados.

FIGURA 13 – INTENSIDADE DE SAXS PARA UMA DISPERSÃO AQUOSA DE LSCa (30,0 mg mL⁻¹/252,3 μmol L⁻¹) A 25 °C (298,15 K), EVIDENCIANDO A CONTRIBUIÇÃO DE DIFERENTES ESTRUTURAS



FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: Os símbolos representam a intensidade experimental de SAXS do LSCa em dispersão (30,0 mg mL⁻¹/252,3 μmol L⁻¹) a 25 °C (298,15 K) na faixa de q de 0,003-0,2 nm⁻¹. A curva em verde corresponde ao melhor ajuste matemático, a curva em azul corresponde à dispersão proveniente dos agregados fractais, enquanto a curva em amarelo corresponde à dispersão atribuída a nanopartículas menores (pequenos agregados cilíndricos) que contribuem para $q > 0,2 \text{ nm}^{-1}$. A curva em cinza representa uma pequena dispersão residual que resta após a subtração da dispersão quase independente de q atribuído à água.

NOTA: Para a dispersão dessas nanopartículas menores, assume-se uma forma de bastão.

TABELA 3 – PARÂMETROS ESTRUTURAIS DETERMINADOS A PARTIR DA ANÁLISE DA INTENSIDADE DE SAXS DE UMA DISPERSÃO DE LSCa A 30 mg mL⁻¹/252,3 μmol L⁻¹ A 25 °C (298,15 K)

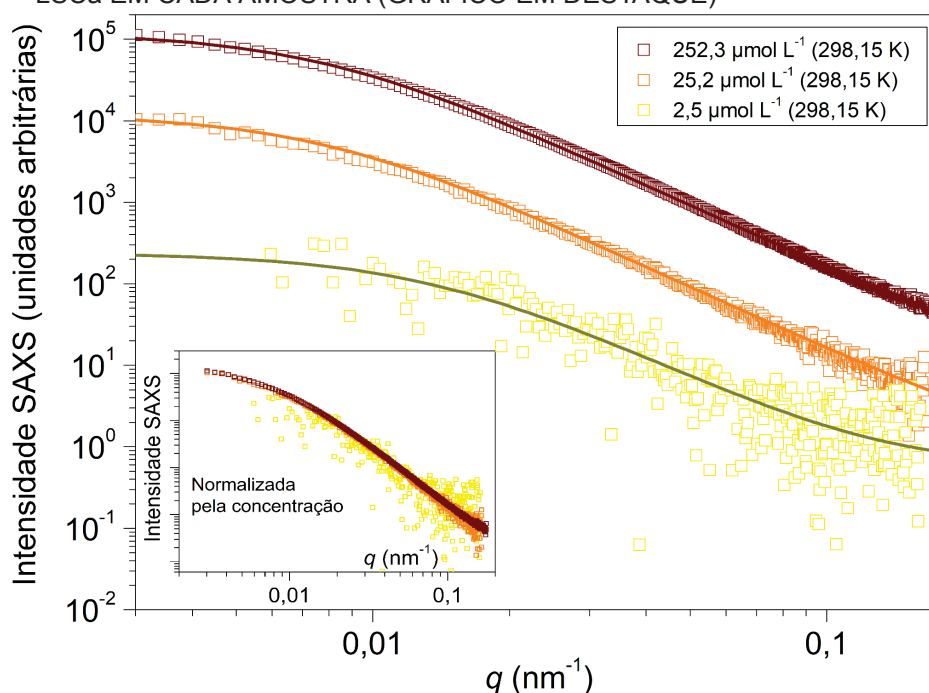
Tipo de estrutura	Diâmetro ± DP (nm)	Comprimento ± DP (nm)	Dimensão Fractal (D)
Agregados fractais	240,0 ± 8,0	-	2,45 ± 0,05
Pequenos agregados cilíndricos	2,5 ± 0,5	20,0 ± 2,0	-

FONTE: A autora (2025).

A Figura 14 mostra a intensidade de SAXS para várias concentrações de LSCa em dispersão, variando de 0,3 a 30,0 mg mL⁻¹ (2,5 a 252,3 μmol L⁻¹) a 25 °C (298,15 K). O gráfico em destaque mostra o mesmo gráfico com a intensidade normalizada pela concentração de lignossulfonato. As curvas normalizadas para 3,0 e 30,0 mg mL⁻¹ (25,2 e 252,3 μmol L⁻¹) são muito semelhantes, indicando que não há mudanças estruturais significativas nos agregados entre essas amostras. Para a

amostra de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), a intensidade de SAXS alinha-se com as amostras de maior concentração para $q > 0,01 \text{ nm}^{-1}$, mas diminui para $q < 0,01 \text{ nm}^{-1}$. As linhas na Figura 14 representam os melhores ajustes das equações (2)–(4) aos dados de SAXS. A Tabela 4 apresenta o diâmetro e a dimensão fractal dos agregados em função da concentração.

FIGURA 14 – INTENSIDADE DE SAXS PARA DISPERSÕES AQUOSAS DE LSCa A $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ($298,15 \text{ K}$), JUNTO ÀS MESMAS CURVAS NORMALIZADAS PELA CONCENTRAÇÃO DE LSCa EM CADA AMOSTRA (GRÁFICO EM DESTAQUE)



FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: Os símbolos representam a intensidade experimental de SAXS do LSCa em dispersão nas concentrações indicadas. As linhas representam as curvas de intensidade de SAXS calculadas usando as equações (2)–(4) que melhor se ajustam aos dados experimentais.

TABELA 4 – DIÂMETRO E DIMENSÃO FRACTAL DOS AGREGADOS DE LSCa EM DISPERSÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

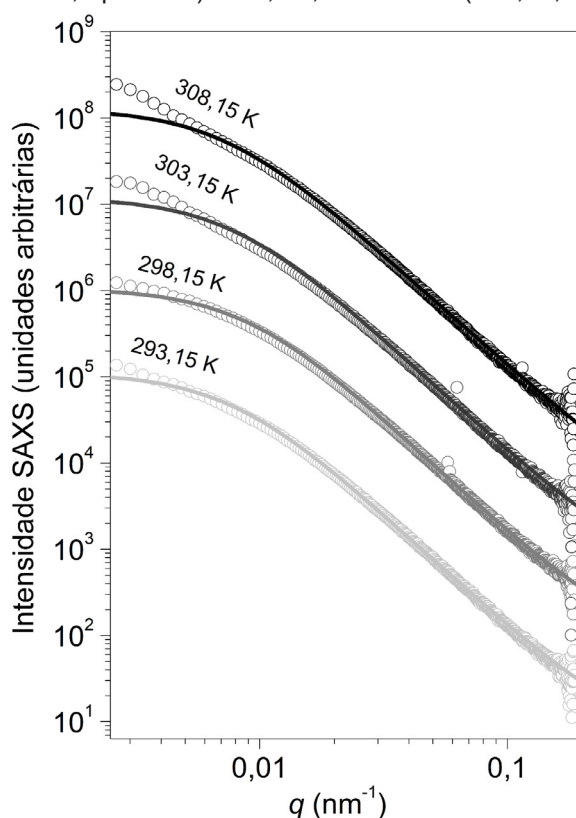
[LSCa] (mg mL^{-1})	[LSCa] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Diâmetro $\pm$ DP (nm)	Dimensão Fractal (D)
0,3	2,5	140 ± 8	$2,45 \pm 0,03$
3,0	25,2	241 ± 5	$2,45 \pm 0,04$
30	252,3	239 ± 5	$2,45 \pm 0,08$

FONTE: A autora (2025).

Para investigar os efeitos da temperatura na estrutura dos agregados de lignossulfonato, mediu-se a intensidade de SAXS para a amostra de $30,0 \text{ mg mL}^{-1}/252,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em temperaturas entre 20 a $35 \text{ } ^\circ\text{C}$ ($293,15$ a $308,15 \text{ K}$). A Figura

15 mostra as curvas de SAXS, deslocadas verticalmente por potências crescentes de 10 para melhor visualização. As curvas da análise de melhor ajuste usando as equações (2)–(4) também são mostradas. As divergências entre as intensidades de SAXS calculadas e experimentais para valores pequenos de q são atribuídas à polidispersidade de tamanho, uma vez que o modelo assume tamanho de agregado monodisperso. À medida que a temperatura aumenta, a intensidade de SAXS excede sistematicamente os valores calculados para pequenos valores de q , sugerindo um crescimento adicional dos agregados com o aumento da temperatura, comprovado também pelos valores de diâmetro na Tabela 5.

FIGURA 15 – INTENSIDADE DE SAXS PARA UMA DISPERSÃO AQUOSA DE LSCa ($30,0 \text{ mg mL}^{-1}/252,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) A 20, 25, 30 E 35 °C (293,15; 298,15; 303,15; 308,15 K)



FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: Os símbolos representam a intensidade experimental de SAXS para o LSCa em dispersão ($30,0 \text{ mg mL}^{-1}/252,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) nas temperaturas indicadas. As linhas representam as curvas de intensidade de SAXS calculadas com base nas equações (2)–(4), representando o melhor ajuste aos dados experimentais e assumindo uma distribuição monodispersa para o tamanho dos agregados de lignossulfonato.

NOTA: As curvas são deslocadas verticalmente por potências crescentes de 10 para maior clareza.

TABELA 5 - DIÂMETRO (2ξ) E DIMENSÃO FRACTAL (D) DOS AGREGADOS DE LSCa EM DISPERSÃO ($30 \text{ mg mL}^{-1}/252,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Diâmetro $\pm$ DP (nm)	Dimensão Fractal (D)
20	293,15	240 ± 8	$2,48 \pm 0,03$
25	298,15	210 ± 5	$2,50 \pm 0,04$
30	303,15	240 ± 5	$2,48 \pm 0,04$
35	308,15	260 ± 4	$2,45 \pm 0,04$

FONTE: A autora (2025).

Alguns trabalhos na literatura supõem formas e tamanhos para o lignossulfonato, especialmente o de sódio. Qian *et al.* (2014) encontraram, para a molécula, um formato de elipsoide oblato com um semi-eixo de 1,6 nm e uma razão axial de 3,5. Yan *et al.* (2010) presumiram que as moléculas desse polímero não são esferas compactas, mas partículas soltas e macias, com diâmetro calculado de 3,4 nm. Além disso, os autores encontraram que, em concentrações acima de $0,05 \text{ g L}^{-1}$, o lignossulfonato de sódio purificado exibe distribuições de tamanho bimodal, com partículas menores em torno de 8,0 nm, que podem ser identificadas como moléculas do polímero, e partículas maiores, que seriam os agregados do lignossulfonato. Lugovitskaya e Naboychenko (2020) também propuseram uma distribuição de tamanho bimodal a partir da concentração de $0,64 \text{ g dm}^{-3}$ e força iônica de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Qiu *et al.* (2010) inferiram que a formação de estruturas agregadas se deu a partir de determinada concentração, definida experimentalmente como $0,38 \text{ g L}^{-1}$. Apesar de alguns estudos mostrarem agregação a partir de uma concentração específica, esse trabalho inova mostrando a presença de agregados fractais e estruturas cilíndricas (distribuição bimodal) em todas as concentrações.

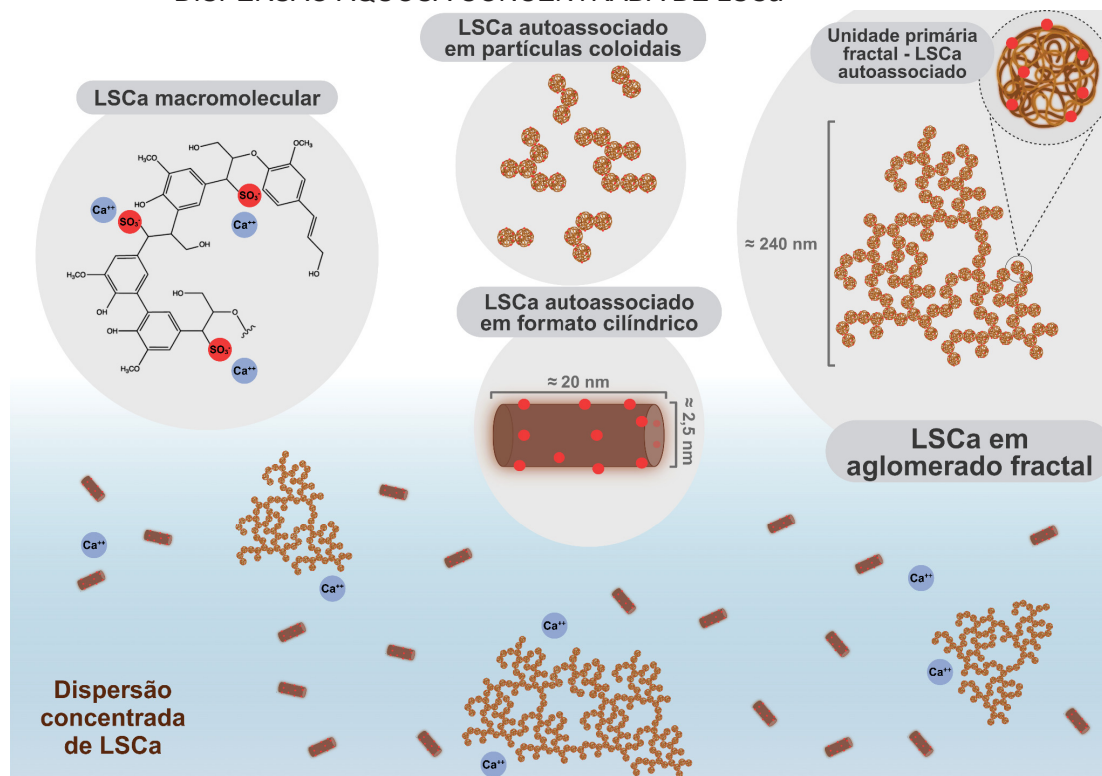
Com relação ao SAXS, Norgren, Edlund e Wågberg (2002) já observavam agregados fractais para a lignina kraft, com dimensões fractais variando de 1,90 a 2,45. Vainio, Lauten e Serimaa (2008) encontraram que lignossulfonatos de baixa massa molecular são compactos e planos e podem ser descritos com um modelo elipsoidal (esferoide oblato com uma razão axial de 3,5) em solução salina semidiluída. As maiores dimensões encontradas para esse polímero foram de 8 nm. Além disso, os autores apresentaram indícios de autoassociação dependente da temperatura. Maziero *et al.* (2012) também encontraram, por SAXS, um comportamento fractal para um certo tipo de lignina não oxidada, com dimensionalidades fractais de 2,47. Esses autores consideraram, também, um formato cilíndrico para o cálculo do raio de giro de monômeros de lignina. Mais

recentemente, Zhang *et al.* (2022) observaram, por meio da técnica de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS), um comportamento fractal para a lignina. Nesse estudo, os autores empregaram, também, um modelo de cilindro rígido para descrever as subunidades da lignina, obtendo um ajuste satisfatório aos dados experimentais.

Vainio *et al.* (2012) mostraram que o estado de agregação é altamente sensível ao contra-íon, à concentração de lignossulfonato, bem como à composição e à constante dielétrica do solvente. Quando a constante dielétrica do solvente é reduzida (em misturas de água-metanol), os coloides de polieletrólito planos preferem se orientar e se organizar de forma que os agregados resultantes mantenham uma estrutura plana. A espessura dessas macromoléculas de polieletrólito e de seus agregados foi estimada em aproximadamente 1,0 a 1,4 nm.

Com base na discussão supracitada, foi elaborado um modelo de estruturas de LSCa, de forma esquemática, para facilitar o entendimento das caracterizações presentes nos tópicos seguintes (Figura 16). Sugere-se, portanto, que as estruturas autoassociadas menores, de formato cilíndrico, estão em quantidade significativa. Nota-se, também, a presença de agregados fractais, compostos de pequenas unidades (formadas de LSCa autoassociado). Estes agregados, de acordo com o discutido, podem apresentar estruturas ainda mais aglomeradas em concentrações e temperatura (especialmente) maiores, formando *clusters* fractais, presentes em menor quantidade.

FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS QUE COMPÕEM UMA DISPERSÃO AQUOSA CONCENTRADA DE LSCa

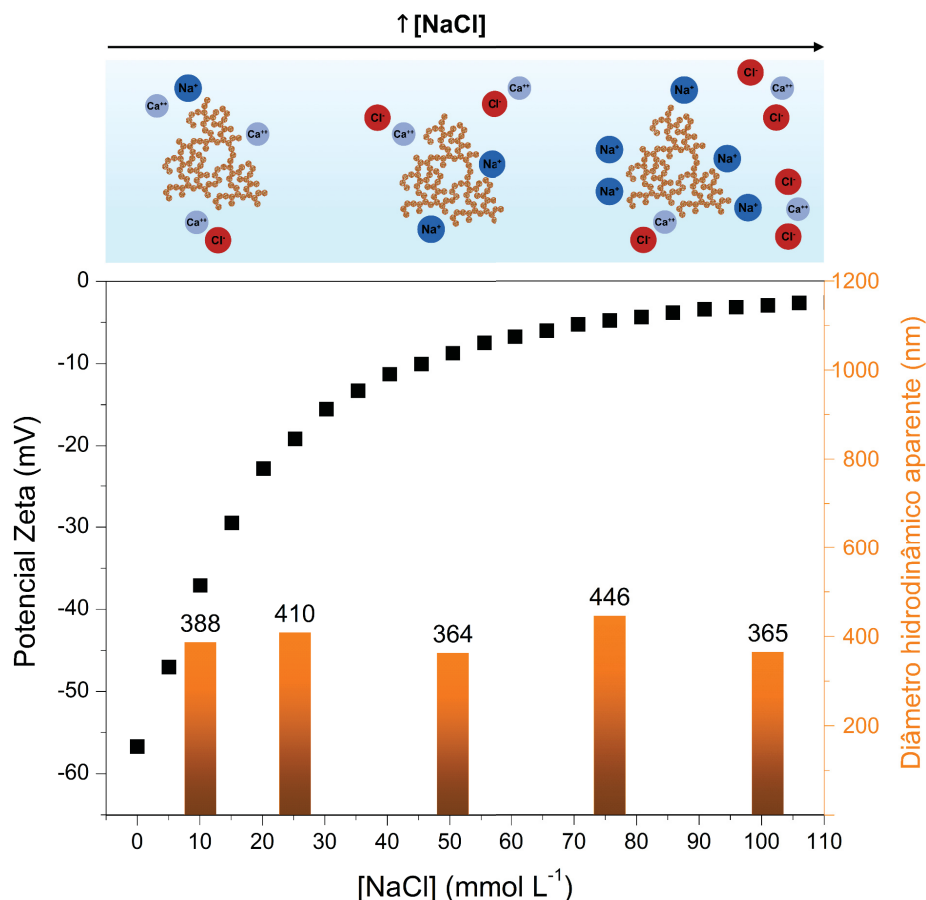


FONTE: A autora (2025).

3.3.1.1 Avaliação da influência da força iônica

Foi realizada uma titulação de NaCl para avaliar a influência do sal no tamanho e no potencial Zeta das estruturas que compõem o LSCa. De acordo com o representado na Figura 17, percebe-se uma tendência à neutralização das cargas no plano de cisalhamento com o aumento da concentração de NaCl, com potencial Zeta quase atingindo 0 mV. Isso acontece pois os íons do sal presentes no meio blindam as cargas superficiais do polímero. O valor de potencial Zeta em baixas concentrações de LSCa é similar ao descrito por Yan *et al.* (2010). Em relação ao tamanho, nota-se que o valor não é alterado com a concentração de força iônica presente no meio. Para polieletrólitos como o lignossulfonato, a presença de sal pode levar a uma alteração no tamanho, tanto pela mudança na conformação da estrutura polimérica, quanto pela agregação proveniente da diminuição do potencial Zeta (Hsiao, 2006). Portanto, neste caso, a presença de sal não influencia substancialmente o diâmetro hidrodinâmico aparente dos agregados de LSCa, e seu efeito sobre o potencial Zeta está em conformidade com o esperado.

FIGURA 17 – ANÁLISE DE POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE DO LSCa EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl (0 A 100 mmol L⁻¹), A 25 °C, COM REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORÇA IÔNICA DO MEIO



FONTE: A autora (2025).

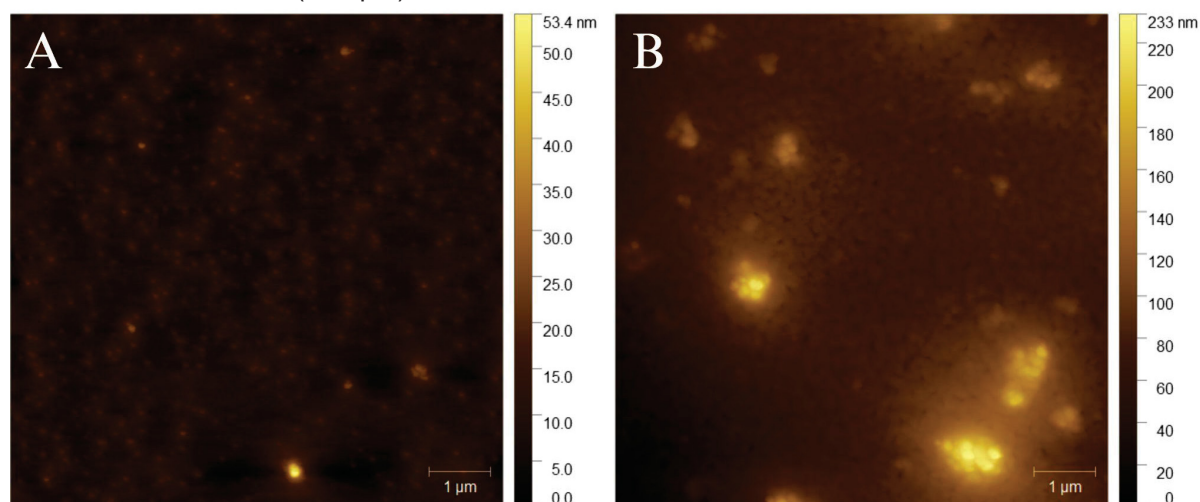
3.3.2 Avaliação da morfologia e da formação de ambientes hidrofóbicos

A técnica de AFM foi realizada para determinar a morfologia e o comportamento microscópico do LSCa. A partir da observação da Figura 18, nota-se que, na concentração de 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as estruturas possuem cerca de 10 nm de altura aparente e em torno de 180 nm de diâmetro aparente, sugerindo uma certa anisotropia, como já revisado por Ruwoldt (2020) para outros lignossulfonatos. Em uma concentração 100 vezes maior, observa-se um aumento na altura das estruturas, o que pode estar relacionado à deposição de maior quantidade de material favorecida pelas interações π - π . O diâmetro aparente também sofre um aumento, indicando que há uma formação de agregados dependente da concentração. Isso está de acordo com o encontrado pela análise de SAXS. Liu *et al.* (2009) utilizaram AFM para modificação da superfície da mica e as estruturas depositadas no substrato revelaram uma morfologia similar ao encontrado na Figura

18, especialmente quando se compara à imagem da mica recém-clivada (Apêndice A).

A morfologia, de forma geral, aparenta ser quase esférica em A (Figura 18), e apresenta agregação de estruturas com o aumento da concentração (B). No entanto, é importante pontuar que a técnica de AFM pode gerar um achatamento da amostra, tanto pela secagem e perda de massa, quanto pela interação do polímero com a superfície da mica. Dessa maneira, o raio da molécula depositada em uma superfície é diferente do raio de giro em solução. Outro fator bastante relevante é o efeito da ponta, que pode superestimar a largura da estrutura (Fu *et al.*, 2024; Lew *et al.*, 2023). Para tentar superar estes desafios, análises de AFM em modo líquido poderiam ser conduzidas, assim como a utilização de uma ponta com menor espessura. Além disso, uma técnica que poderia ser aplicada é a Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão, que poderia minimizar artefatos de secagem.

FIGURA 18 – IMAGENS DE TOPOGRAFIA DE AFM EM MODO *TAPPING* DO LSCa DEPOSITADO EM MICA (8X8 μm)



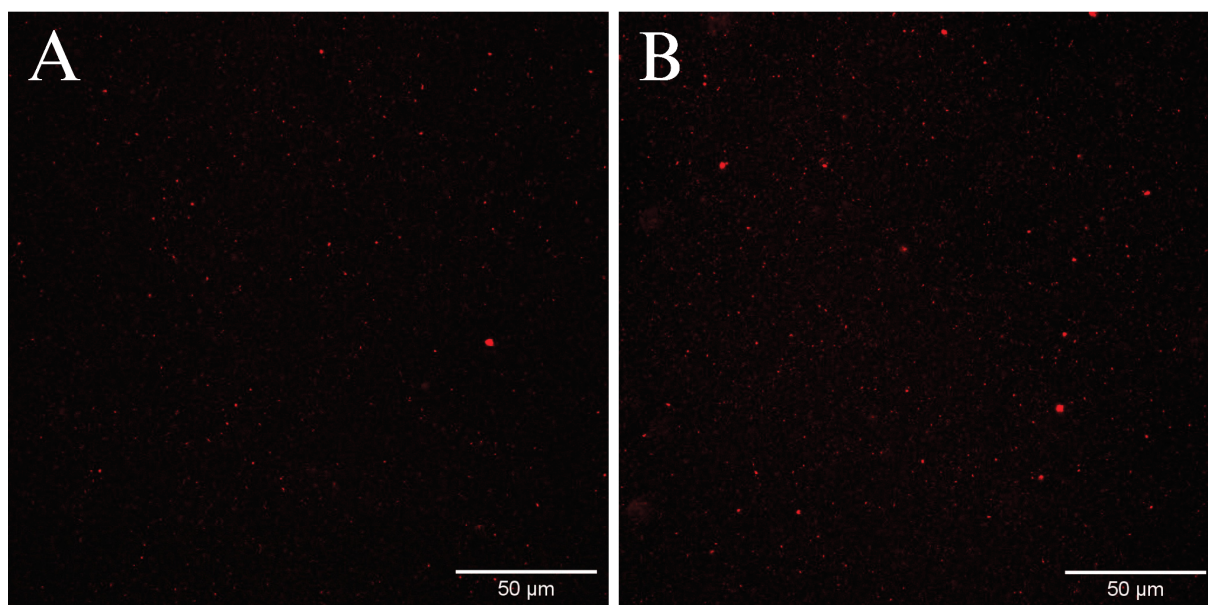
FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: A representa uma dispersão de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LSCa e B representa uma dispersão de $252,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LSCa.

A partir da observação da Figura 19, nota-se a formação de pequenas estruturas arredondadas coradas pelo vermelho do Nilo, que possui afinidade por ambientes oleosos. Observa-se que, mesmo na ausência de óleo na amostra, foram identificados ambientes hidrofóbicos. Essa informação está de acordo com o já evidenciado por Yan *et al.* (2010). Não foi possível realizar a determinação de tamanho aparente por essa técnica, já que a CLSM mede com precisão estruturas

acima de 1 μm . Em condições ideais, a resolução lateral pode atingir cerca de 200 nm e a resolução axial, cerca de 500 nm. Sugere-se, aqui, que as estruturas coradas e visíveis com o corante fluorescente sejam os aglomerados fractais, pela comparação entre as dimensões esperadas e as dimensões visíveis. Além disso, nota-se um aumento na população de estruturas em função da concentração, o que é compatível com o encontrado nas imagens de AFM.

FIGURA 19 – IMAGENS DE CLSM DE DISPERSÕES DE LSCa CORADAS COM VERMELHO DO NILO



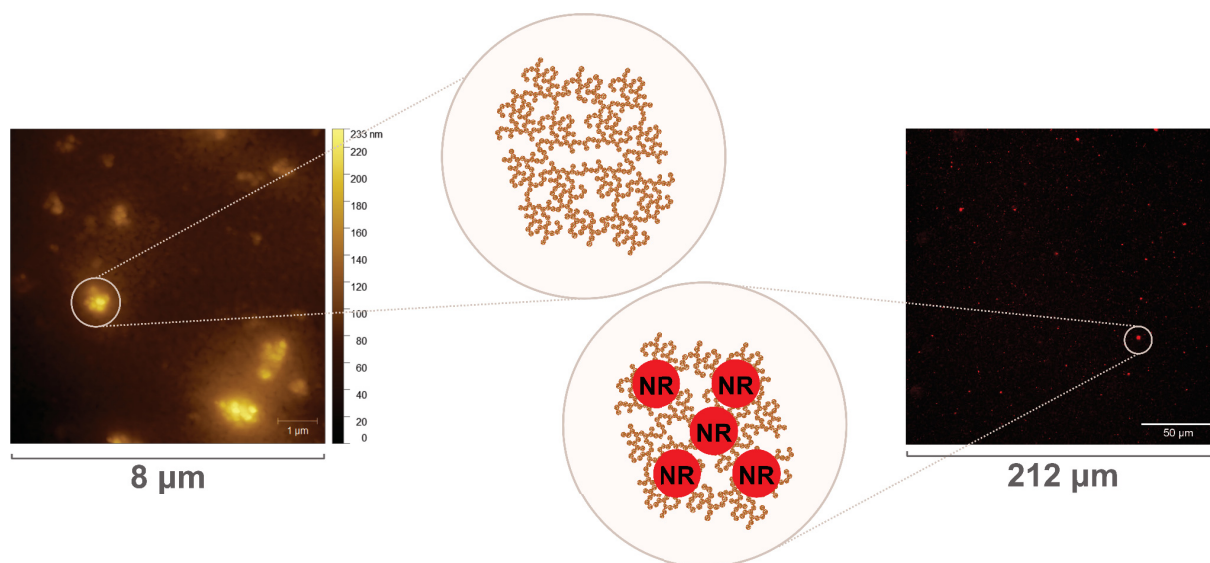
FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: *A* representa uma dispersão aquosa de $25,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LSCa e *B* representa uma dispersão aquosa de $252,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LSCa.

NOTA: As imagens estão representadas no aumento de 60x e foram tratadas da mesma forma.

Para melhor entendimento, foi elaborado um esquema representado na Figura 20, comparando a mesma concentração de LSCa em duas técnicas de microscopia. Associou-se os agregados presentes em ambas as imagens a grandes aglomerados fractais, dotados de ambientes hidrofóbicos.

FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS TÉCNICAS DE AFM E CLSM, DE FORMA COMPARATIVA, JUNTO ÀS ESTRUTURAS DE LSCa ASSOCIADAS



FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: A imagem da esquerda representa a imagem de topografia de AFM de uma dispersão aquosa de LSCa na concentração de $252,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. A imagem da direita representa a imagem de CLSM no aumento de 60x de LSCa na mesma concentração. "NR" representa o corante vermelho do Nilo, do inglês *Nile Red*.

NOTA: As estruturas apresentadas esquematicamente representam alguns agregados fractais unidos, formando um aglomerado fractal.

3.3.3 Avaliação das propriedades tensoativas

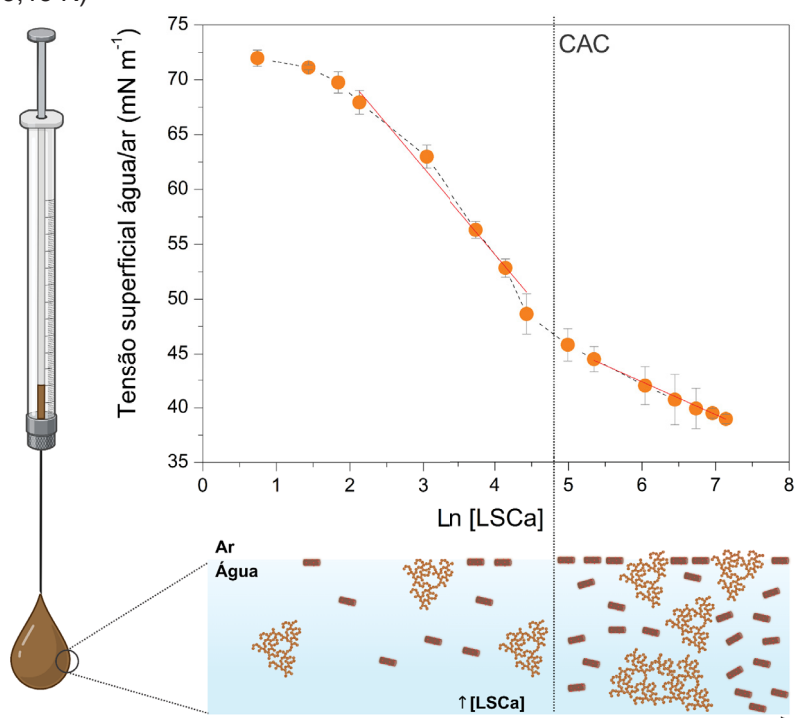
A técnica de tensiometria foi aplicada ao LSCa para avaliar de forma detalhada a atividade de superfície do biopolímero e comprovar o seu efeito surfactante. Para isso, foi realizado o ensaio de gota pendente em uma temperatura definida, na interface água-ar, variando a concentração de LSCa. Parâmetros necessários ao desenvolvimento do experimento, tal qual o tempo de leitura da tensão interfacial e forma de preparo das dispersões, foram definidos anteriormente e encontram-se no Apêndice B. Dessa maneira, foi definido que a forma de preparo mais adequada foi a diluição seriada e o tempo mais adequado foi o de 90 segundos.

A partir da observação da Figura 21 e da Tabela 6, é possível notar que o LSCa apresenta um comportamento característico de surfactante. A isoterma de Gibbs mostra uma tendência de diminuição da tensão superficial, devido ao aumento da concentração de moléculas/agregados anfifílicos. Esses componentes se organizam e reorganizam na interface água/ar, com os domínios hidrofóbicos voltados para o ar e os domínios hidrofílicos voltados para o ambiente aquoso,

diminuindo a tensão entre as duas fases. Em sistemas com surfactantes tradicionais, como o SDS (Apêndice C), as moléculas tensoativas se organizam na interface até uma concentração específica de saturação, e a partir dela a tensão superficial permanece constante. Essa concentração, em sistemas compostos por surfactantes tradicionais, é denominada concentração micelar crítica (CMC); quando se trata de sistemas compostos por polieletrólitos, esse ponto é chamado de concentração de agregação crítica (CAC) (Ge; Li; Li, 2014).

No caso do LSCa, um surfactante não típico, a hipótese é que as estruturas anfifílicas, com tamanho e composição heterogênea, estejam em constante reorganização na interface, acarretando a ausência de um platô bem definido após atingir a CAC. Um comportamento similar foi observado por Lugovitskaya e Kolmachikhina (2021), que realizaram análises de tensão superficial pelo método da placa de Wilhelmy. As três amostras de lignossulfonato testadas pelos autores também não apresentaram uma queda e um platô bem definido na isoterma de Gibbs. Isso também foi observado na isoterma obtida para o lignossulfonato de sódio por Yan *et al.* (2010), por Zhou *et al.* (2012) e mais recentemente por Lugovitskaya e Rogozhnikov (2023).

FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA BASEADA NA ISOTERMA DE GIBBS DE ANÁLISES TENSIO MÉTRICAS DO LSCa EM INTERFACE ÁGUA/AR, A 20 °C (293,15 K)



FONTE: A autora (2025).

TABELA 6 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS OBTIDOS POR TENSIONMETRIA PARA O LSCa À 20 °C

Parâmetros de superfície	Valores obtidos
CAC	16 mg mL ⁻¹ / 134,6 µmol L ⁻¹
Γ	1,7 µmol m ⁻²
A _{min}	100 Å ² molécula ⁻¹
π	25,2 mN m ⁻¹

FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: CAC representa concentração de agregação crítica, Γ representa concentração de excesso superficial, A_{min} representa a área mínima ocupada por molécula na interface e π representa a pressão superficial.

Qiu *et al.* (2009) desenvolveram um teste de tensão superficial utilizando o método do anel de tração. A isoterma elaborada pelos autores para o sistema contendo apenas lignossulfonato de cálcio teve um comportamento similar de queda ao encontrado na Figura 21. A tensão superficial na maior concentração (100 mg mL⁻¹) apresentou uma diferença de cerca de 5 mN m⁻¹ em comparação ao encontrado neste trabalho para a mesma concentração, fato que pode ser associado à natureza heterogênea do material e ao método empregado. Já Chique e colaboradores (2023) fizeram um experimento semelhante e o resultado obtido para o lignossulfonato de cálcio, em pH 6, foi correspondente ao encontrado neste trabalho. No entanto, os autores observaram o comportamento de queda até uma concentração de 0,8 mg mL⁻¹ e em pH 6-11. O ensaio realizado neste trabalho compreendeu um intervalo de concentração de 0,25-150,00 mg mL⁻¹ e de pH de 7,0-5,3, decrescente com o aumento de concentração. Por fim, Ruwoldt, Planque e Øye (2020) mostraram um comportamento similar de queda da tensão interfacial com o aumento da concentração, porém, na interface xileno/água com adição de NaCl 3% (m m⁻¹).

Com relação à Tabela 6, nota-se que os valores dos parâmetros de superfície estão de acordo com os encontrados na literatura para materiais à base de lignina. Referente ao valor de pressão superficial, Ruwoldt e Øye (2020) encontraram valores que variaram de cerca de 10,5-20 mN m⁻¹ para duas frações de lignossulfonato 1g L⁻¹, porém, na presença de 20 mmol L⁻¹ NaCl e 1 mmol L⁻¹ de etanol, que possui efeito tensoativo. A respeito da área ocupada por molécula na interface, Ruwoldt *et al.* (2024) encontraram uma área de 185 ± 8 Å² por molécula de

lignina Kraft esterificada C₁₈, com média ponderal de massa molar de $1,36 \times 10^4$ g mol⁻¹. Ge, Li e Li (2014) encontraram valores muito semelhantes ao representado na Tabela 6, que variaram de 106-190 Å² por molécula de lignossulfonato de sódio. Uma área ligeiramente maior foi encontrada por Ruwoldt, Planque e Øye (2020), com valores que variaram de 221-358 Å² por molécula de diversas amostras de lignossulfonato. Em vista disso, é possível inferir que apenas uma porção da molécula se posiciona na interface, já que lignossulfonatos e ligninas de diversas massas molares apresentaram uma medida de área similar. No caso das estruturas já caracterizadas neste trabalho, sugere-se que tanto estruturas cilíndricas quanto agregados fractais podem se localizar na interface entre os dois fluidos testados, como representado esquematicamente na Figura 21.

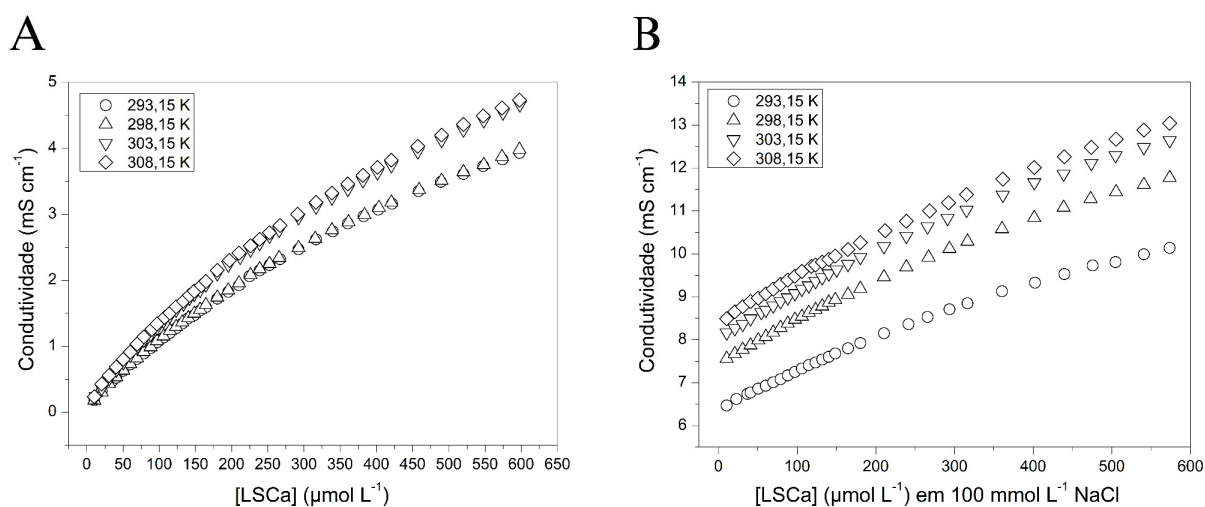
A CAC de lignossulfonatos pode variar de acordo com a pureza da amostra, o grau de sulfonação, a massa molar, o pH da dispersão e a temperatura, por exemplo (Lugovitskaya; Rogozhnikov, 2023). No entanto, valores muito semelhantes de CAC foram encontradas para lignossulfonatos de massas molares expressivamente menores (3638-6423 g mol⁻¹), variando de 16,72 a 40,06 mg mL⁻¹ (Ge; Li; Li, 2014). Valores muito menores foram encontrados por Qiu *et al.* (2010), de 0,38 mg mL⁻¹, e por Yan *et al.* (2010), de 0,05 g L⁻¹. Justifica-se a diferença pelos métodos empregados pelos autores, que se basearam em espectroscopia UV e fluorescência.

Portanto, os resultados confirmam o comportamento surfactante do LSCa, evidenciado pela redução da tensão superficial com o aumento da concentração. Alwadani e Fatehi (2018) relataram que os lignossulfonatos têm baixa afinidade para diminuir a tensão interfacial da interface óleo-água ou a tensão superficial da água, o que limita suas aplicações. No entanto, percebe-se, que, neste estudo, o grau de decaimento da tensão superficial foi bastante relevante, demonstrando uma boa atividade surfactante, semelhante ao encontrado para o SDS, surfactante amplamente empregado (Apêndice C). A ausência de um platô bem definido na isoterma de Gibbs sugere uma reorganização contínua das estruturas anfífilas na interface. Os valores dos parâmetros de superfície obtidos estão alinhados com estudos anteriores, reforçando a influência da heterogeneidade estrutural e das condições experimentais na CAC do lignossulfonato. Dessa forma, as características interfaciais do LSCa indicam seu potencial como agente tensoativo em formulações diversas.

3.3.4 Determinação de parâmetros físico-químicos e termodinâmicos

As análises de titulação condutimétricas foram realizadas com o propósito de determinar a CAC, como contraponto à determinação por tensiometria, além de determinar parâmetros termodinâmicos de micelização, tais quais a variação de entropia (ΔS), de entalpia (ΔH) e da energia livre de Gibbs (ΔG) do LSCa. Lugovitskaya e Naboychenko (2020) já haviam observado que a condutividade elétrica dos lignossulfonatos é complexa, e depende de fatores como concentração, massa molecular, natureza e comportamento do contra-íon, bem como da temperatura. Nota-se, na Figura 22, um comportamento de curva semelhante ao representado por Li *et al.* (2012), especialmente em baixas concentrações de LSCa.

FIGURA 22 – TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA DO LSCa (600 A 0 mmol L⁻¹) COM E SEM A PRESENÇA DE NaCl (100 mmol L⁻¹), COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DE 293,15 A 308,15 K



FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: A representa as curvas de titulação em água ultrapurificada e B representa as curvas de titulação em ambiente de força iônica constante.

Nota-se, na Tabela 7, uma diferença de valor de CAC por determinação via interface (tensiometria) e determinação em solução (condutimetria), já que a CAC obtida por tensiometria foi de 16 mg mL⁻¹. Essa disparidade entre valores pode ser atribuída ao fato de que a tensiometria detecta a formação de agregados na interface ar/líquido, enquanto a condutimetria avalia alterações na condutividade elétrica da solução, que ocorrem com a formação de micelas ou estruturas agregadas em meio aquoso — refletindo, portanto, diferentes aspectos e estágios do processo de autoassociação do surfactante. Assim, as diferenças entre os valores

de CAC obtidos por tensiometria e condutimetria não são necessariamente conflitantes, mas, sim, complementares. A partir dos valores de CAC, foi possível calcular a fração molar da CAC (X) e o $\ln X$, além de determinar os gráficos de $\ln X$ CAC em função da temperatura (K) (Apêndice D). Os coeficientes angulares das tendências lineares nesses gráficos são necessários para os cálculos dos parâmetros termodinâmicos.

A partir da observação da Tabela 7, é possível perceber que em ambas as condições o processo de micelização é espontâneo ($\Delta G < 0$). O sinal da variação de entalpia ($\Delta H > 0$) sugere que em ambas as situações o processo é endotérmico, sendo que na presença de sal a energia necessária é menor. Dessa forma, a energia é absorvida e a energia dos produtos é maior que a energia dos reagentes. A entropia do sistema durante o processo aumenta ($\Delta S > 0$), mas aumenta em menor grau na presença de sal.

Em vista do discutido, o processo de micelização, sem sal, tem maior efeito de cabeça do surfactante. Com a adição de sal, percebe-se que nas duas primeiras temperaturas a tendência parece ser crescente, demonstrando um efeito de blindagem do NaCl na parte sulfonada do surfactante (cabeça), apresentando um maior efeito da cauda no processo.

Em relação à CAC, nota-se que, na titulação sem sal, os valores permanecem estáveis. Relacionado à titulação com sal, observa-se que os valores também permanecem estáveis, aparentemente maiores em relação à titulação sem sal.

Para fins de comparação com um surfactante padrão e checagem do método e do equipamento, realizou-se uma titulação com o dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20 °C (293,15 K) (Apêndice C). O valor de CMC obtido foi de 8,06 mmol L⁻¹, estando de acordo com o encontrado na literatura (Motin; Mia; Islam, 2015).

TABELA 7 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E TERMODINÂMICOS APROXIMADOS PARA O LSCa

Parâmetros termodinâmicos	Água ultrapurificada				NaCl 100 mmol L ⁻¹			
	Temperatura (K)				Temperatura (K)			
	293,15	298,15	303,15	308,15	293,15	298,15	303,15	308,15
α	0,48	0,48	0,47	0,46	0,55	0,55	0,55	0,59
CAC (g L ⁻¹)	30,68	29,25	28,86	29,61	33,14	33,49	32,59	32,55
CAC (μ mol L ⁻¹)	258,0	246,0	242,7	249,0	278,7	281,7	274,1	273,8
X	$4,6 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$	$4,5 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$5,1 \times 10^{-6}$	$4,9 \times 10^{-6}$	$4,9 \times 10^{-6}$
Ln X	-12,28	-12,33	-12,34	-12,32	-12,20	-12,19	-12,22	-12,22
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-45,6	-46,3	-47,6	-48,5	-43,1	-43,8	-44,5	-44,2
ΔH (kJ mol ⁻¹)	6,7	6,9	7,2	7,4	1,7	1,7	1,8	1,8
ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,15	0,15	0,15	0,15

FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: α é o grau de ionização; CAC representa a concentração de agregação crítica; X representa a fração molar; ΔG é a variação da energia livre de Gibbs (kJ mol⁻¹); ΔH é a variação de entalpia (kJ mol⁻¹); ΔS é a variação de entropia (kJ mol⁻¹ K⁻¹).

3.3.5 Determinação do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico

A determinação do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) foi realizada para entender a função do LSCa como um tensoativo e facilitar sua possível aplicação em estudos posteriores. Foi preparado um branco (B), com água e óleo mineral, além de 15 emulsões de óleo e água, variando-se as concentrações de surfactantes e mantendo fixa a concentração de água e fase oleosa. A partir da visualização das emulsões em série após 24 horas, preparadas de acordo com a Tabela 8, foi possível notar que a emulsão mais estável foi a de número 1 (Figura 23). Essa amostra foi selecionada por apresentar uma maior fração aparente de fase oleosa emulsionada, o que indica maior estabilidade do sistema e melhor capacidade dos tensoativos em emulsionar a fração oleosa da formulação. As porções inferiores dos tubos, representadas na Figura 23, representam a fase aquosa sedimentada. Dessa forma, o EHL da emulsão mais estável é igual ao EHL do emulsionante problema, o LSCa. O EHL do LSCa, portanto, é maior que 20, demonstrando que este tensoativo

tem maior ação detergente e solubilizante (Alwadani; Fatehi, 2018). Assim, esse tensoativo possui uma maior influência da porção polar, caracterizando um surfactante hidrofílico.

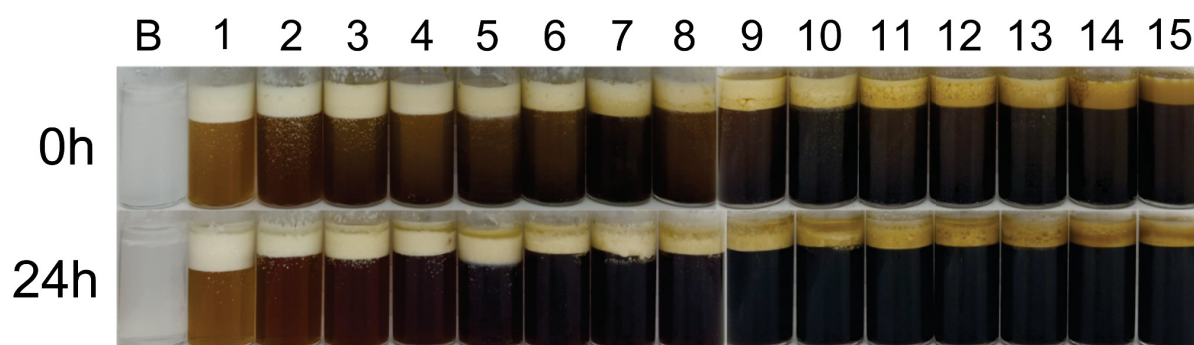
TABELA 8 – COMPOSIÇÃO DAS EMULSÕES PARA DETERMINAÇÃO DO EHL DO LSCa

Emulsão	Composição do emulsionante (5% do total)		Óleo mineral/Vaselina líquida USP (%)	Água (g)
	Span® 80 (%r)	LSCa (%r)		
1	97,5 (0,195 g)	2,5 (0,005 g)	10 (0,4 g)	qsp. 4
2	95 (0,19 g)	5 (0,01 g)	10	qsp. 4
3	92,5 (0,185 g)	7,5 (0,015 g)	10	qsp. 4
4	90 (0,18 g)	10 (0,02 g)	10	qsp. 4
5	87,5 (0,175 g)	12,5 (0,025 g)	10	qsp. 4
6	85 (0,17 g)	15 (0,03 g)	10	qsp. 4
7	82,5 (0,165 g)	17,5 (0,035 g)	10	qsp. 4
8	80 (0,16 g)	20 (0,04 g)	10	qsp. 4
9	70 (0,14 g)	30 (0,06 g)	10	qsp. 4
10	60 (0,12 g)	40 (0,08 g)	10	qsp. 4
11	50 (0,10 g)	50 (0,10 g)	10	qsp. 4
12	40 (0,08 g)	60 (0,12 g)	10	qsp. 4
13	30 (0,06 g)	70 (0,14 g)	10	qsp. 4
14	20 (0,04 g)	80 (0,16 g)	10	qsp. 4
15	10 (0,02 g)	90 (0,18 g)	10	qsp. 4

FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: %r representa a porcentagem relativa de emulsionante em relação à quantidade total de emulsionante (5% relativo ao conteúdo total da emulsão). Todas as % estão representadas em massa.

FIGURA 23 – EMULSÕES (1-15) PREPARADAS PARA DETERMINAÇÃO DO EHL NO TEMPO 0 E APÓS 24 HORAS



FONTE: A autora (2025).

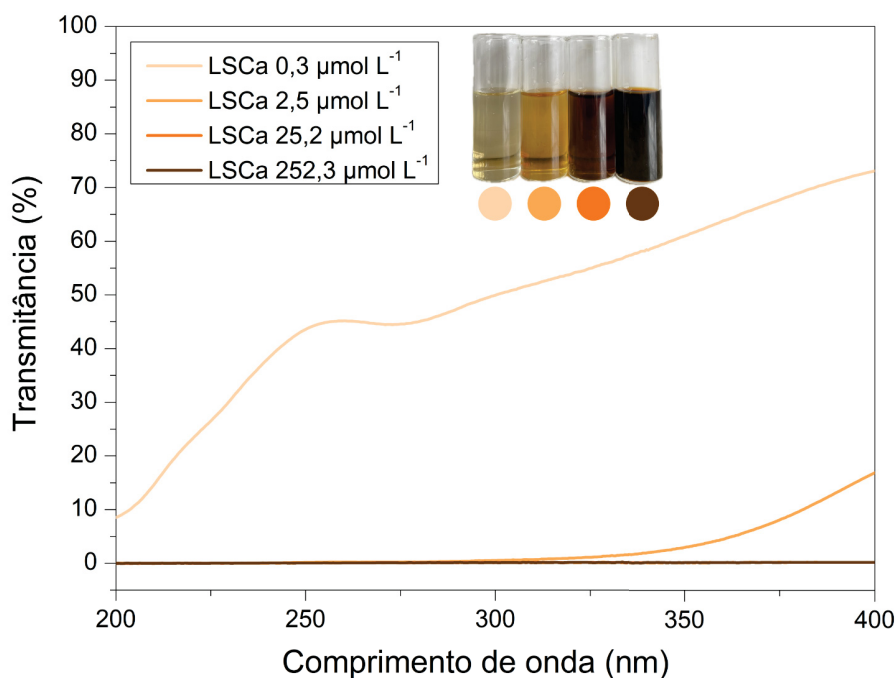
As emulsões foram preparadas, de início, no ultrassom de ponta, responsável por fornecer maior energia quando comparado a agitadores mecânicos. No entanto, notou-se que, apesar de maior emulsificação da fase oleosa, a amostra apresentou muita espuma, dificultando a visualização macroscópica da fase oleosa isolada após 24 horas. Portanto, as emulsões apresentadas na Figura 23 são provenientes de emulsificação com agitador de tubos, a fim de promover uma menor formação de espuma.

3.4 AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS APLICAÇÕES

3.4.1 Determinação da atividade de bloqueio ultravioleta

A atividade de bloqueio ultravioleta de dispersões aquosas de LSCa em concentração crescente foi avaliada e os resultados estão representados de forma esquemática na Figura 24. Observa-se, na concentração mais baixa ($0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$), uma transmitância de cerca de 70 a 10%. Na concentração de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, a dispersão foi capaz de bloquear aproximadamente de 90 a 100% da radiação emitida pelo espectrofotômetro. Nas duas concentrações posteriores ($25,2$ e $252,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) a transmitância foi de cerca de 0%, mostrando um aparente bloqueio total da radiação UV em todos os comprimentos de onda mostrados na Figura 24.

FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ANÁLISE DA TRANSMITÂNCIA DE DISPERSÕES DE LSCa NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,3, 2,5, 25,2 E 252,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EM ÁGUA PURIFICADA



FONTE: A autora (2025).

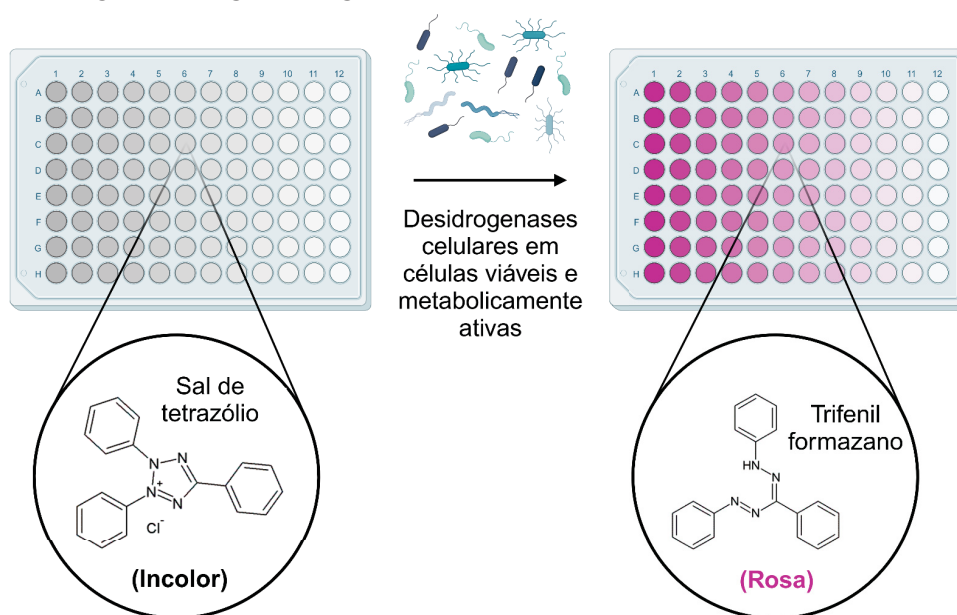
Esse ensaio foi particularmente relevante para a pesquisa sobre fotoprotetores, pois o comportamento macroscópico das dispersões mostra uma característica translúcida, especialmente nas três primeiras concentrações testadas. Isso sugere que a atividade de fotoproteção acontece através de mecanismos químicos, por intermédio da absorção da radiação pelas hidroxilas fenólicas e cetonas presentes nas moléculas de lignossulfonato (Lee *et al.*, 2020). Os resultados demonstram que as dispersões de LSCa apresentam uma capacidade de bloqueio UV mesmo em concentrações relativamente baixas. Assim, a molécula mostra potencial para aplicação em emulsões fotoprotetoras, combinando o efeito físico de dispersão opaca com a absorção química da radiação UV, o que pode contribuir para o desenvolvimento de formulações mais eficazes e seguras.

3.4.2 Avaliação de propriedades antimicrobianas

A amostra de LSCa foi submetida a ensaios de susceptibilidade a microrganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A concentração inicial do LSCa foi de 420,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A partir dessa concentração, a amostra foi diluída por meio de diluição seriada para avaliar sua eficácia

antimicrobiana e determinar a sua concentração inibitória mínima (CIM). Após o período de incubação de 22 horas, mais 2 horas com a presença do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), foi possível observar os resultados do ensaio. Quando há células viáveis e metabolicamente ativas, enzimas celulares bacterianas (particularmente desidrogenases) reduzem o TTC (incolor) a trifênil formazano (TF) (rosa) (Figura 25). No caso das leveduras, essa reação não aconteceu e a determinação foi visual.

FIGURA 25 – MECANISMO DE REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA A DETECÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS VIÁVEIS



FONTE: A autora (2025).

As CIMs foram determinadas e estão representadas na Tabela 9, com figuras dos testes apresentadas no Apêndice E. Nota-se que o LSCa foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos, apresentando uma atividade mais expressiva frente ao *S. aureus* (gram positiva), em concordância com o descrito em literatura. A CIM para essa bactéria foi de $3,10 \text{ mg mL}^{-1}$, valor que é correspondente a uma concentração de $0,31\% \text{ (m v}^{-1}\text{)}$. Verrillo *et al.* (2021) encontraram valores de CIM para o lignossulfonato de cálcio de $0,01 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (*S. aureus*) e de $0,05 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (*E. coli*). Valores diferentes podem ser explicados pela natureza heterogênea do material e pela possível diferença de conteúdos fenólicos e grupos sulfonatos, responsáveis por causar uma desorganização na membrana celular (Sugiarto *et al.*, 2022). Já Dong *et al.* (2011) encontraram um valor de CIM de $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$ (*S. aureus*) para uma lignina comercial (resíduo de lignina da palha de milho para

produção de etanol). Esse achado apresenta uma similaridade com o encontrado na Tabela 9 para o mesmo microrganismo.

TABELA 9 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM, mg mL⁻¹) DO LSCa FRENTE A *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* E *Candida albicans* APÓS 22 HORAS DE INCUBAÇÃO

Microrganismo	Concentração inibitória mínima (CIM, mg mL ⁻¹)	Concentração inibitória mínima (CIM, μmol L ⁻¹)
<i>C. albicans</i>	12,5	105,1
<i>E. coli</i>	6,3	53,0
<i>S. aureus</i>	3,1	26,1

FONTE: A autora (2025).

A atividade antimicrobiana de lignossulfonatos e lignina contra bactérias gram-positivas pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos, conhecidos por comprometer a integridade da membrana celular, levando à inibição do crescimento ou morte celular. Além disso, determinadas características químicas da cadeia lateral da lignina, como a presença de uma ligação dupla entre os carbonos α e β ou um grupo metil no carbono γ (maior hidrofobicidade), podem estar envolvidas na ação deletéria observada contra os microrganismos testados. Em contrapartida, a maior resistência relativa das bactérias gram-negativas pode ser atribuída à presença de uma membrana externa adicional, que atua como uma barreira protetora contra diversas substâncias (Nikaido, 2009; Gordobil *et al.*, 2018; Cueva *et al.*, 2010; Barber; Mcconnell; Decaux, 2000; Espinoza-Acosta *et al.*, 2016; Sugiarto *et al.*, 2022). A supressão do crescimento bacteriano também pode estar relacionada à inibição de reações radicais por ligninas e lignossulfonatos (Verrillo *et al.*, 2021).

Com relação à atividade contra *Candida albicans*, a CIM encontrada foi de 12,5 mg mL⁻¹, representando uma concentração de 1,25% (m v⁻¹). Jha e Kumar (2018) relataram valores de CIM de 64–128 μg mL⁻¹ (*Candida* spp.) para o lignossulfonato de sódio, o que representa 0,064–0,128 mg mL⁻¹. Os autores não detalham explicitamente os mecanismos de ação específicos contra as espécies de *Candida* spp., mas descrevem que a atividade antifúngica pode estar relacionada à interferência na membrana celular, interação com alvos celulares e aumento da eficácia de antifúngicos padrões (efeito sinérgico). Os mesmos autores, Jha e Kumar, (2023), tempo depois, encontraram uma CIM de 64 μg mL⁻¹ (*Candida*

albicans) para o lignossulfonato de sódio. Nesse estudo, os autores comprovaram a perturbação na membrana celular e aumento da permeabilidade da membrana, por intermédio da ligação do biopolímero ao ergosterol na membrana celular fúngica. Por fim, Dong *et al.* (2011) encontraram um valor de CIM de 10 mg mL⁻¹ (*C. lipolytica*) para uma lignina comercial, muito similar ao encontrado para a *C. albicans* na Tabela 9.

Para determinar a natureza da atividade antimicrobiana da amostra de LSCa, foram realizados experimentos com base nos poços das microplacas onde o crescimento de células microbianas foi inibido. Esse teste foi realizado após a execução do teste de microdiluição em caldo e os resultados estão representados no Apêndice E. Com esse procedimento realizado foi possível observar se as células foram capazes de se recuperar e proliferar no ágar, diferenciando entre efeitos bacteriostáticos ou fungistáticos (inibição temporária do crescimento) e efeitos bactericidas ou fungicidas (eliminação completa das células), de acordo com a ausência ou presença de crescimento microbiano nos meios de cultura.

Os tratamentos com LSCa apresentaram atividades fungistática e bacteriostática, já que, nas placas de Petri, foi observado o crescimento das bactérias e da levedura na CIM. Isso indica que, embora tenham conseguido inibir temporariamente o crescimento dos microrganismos, as células microbianas não foram completamente eliminadas e retomaram seu crescimento quando expostas a um ambiente sem agentes antimicrobianos. No entanto, observou-se um efeito importante contra o *S. aureus* na concentração de 25 mg mL⁻¹, com a presença de apenas uma colônia aparente da bactéria. Sugere-se, então, que em concentrações maiores de LSCa a eficácia antimicrobiana aumenta, podendo agir como bactericida e evidenciando que o efeito bactericida e bacteriostático pode ser dependente da dose. Para confirmar este fato, faz-se necessário o desenvolvimento de um maior número de replicatas experimentais, considerando concentrações maiores de LSCa.

Os resultados desta análise destacam o potencial do LSCa como um agente antimicrobiano e antifúngico, com sensibilidade maior contra *Staphylococcus aureus*. Diante do aumento da resistência microbiana e da necessidade de novos antimicrobianos, a valorização de subprodutos industriais como a lignina se apresenta como uma estratégia sustentável e promissora (Sugiarto *et al.*, 2022). Estudos futuros devem aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação e

otimizar a estrutura química desses biopolímeros para ampliar sua eficácia e viabilidade em aplicações biomédicas e industriais.

3.4.3 Avaliação do potencial de defesa contra *Botrytis cinerea* em *Vitis vinifera* L.

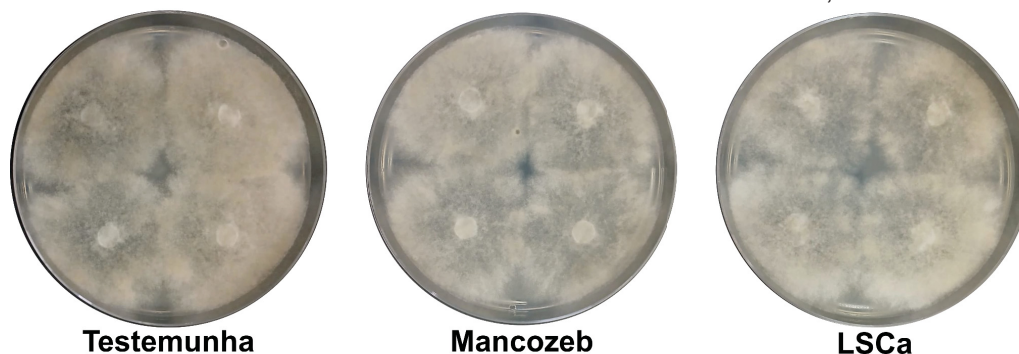
3.4.3.1 Ensaio *in vitro* de crescimento micelial do patógeno *Botrytis cinerea*

O ensaio para avaliar o crescimento micelial do patógeno *Botrytis cinerea* foi realizado frente aos tratamentos: fungicida mancozeb, testemunha (água purificada estéril) e LSCa. Essa análise foi realizada para comprovar que o fungo está ativo e para determinar se o fungo é sensível aos tratamentos.

O crescimento micelial para o *Botrytis cinerea* foi avaliado após 7 dias de incubação. Em todos os tratamentos houve o crescimento micelial do fungo mesmo nas concentrações mais elevadas (Figura 26), indicando que tanto o LSCa quanto o fungicida não exerceram inibição para o patógeno *Botrytis cinerea*. Isso comprova que o mancozeb não é o fungicida mais indicado para o tratamento desse patógeno em uva. Além disso, mostra que o LSCa não exerce ação inibitória sobre o fungo, podendo até funcionar como substrato para o crescimento fúngico, atuando como uma fonte de carbono, como já relatado em literatura (Aiken; Logan, 1996; Rönnander; Wright, 2021).

O cálculo do diâmetro das colônias foi realizado e não revelou diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, a sobreposição das colônias comprometeu a precisão e a confiabilidade dos resultados, razão pela qual os diâmetros não serão apresentados.

FIGURA 26 – ENSAIO *IN VITRO* PARA AVALIAR O CRESCIMENTO MICELIAL DO *BOTRYTIS CINEREA* UTILIZANDO OS TRATAMENTOS DE FUNGICIDA, TESTEMUNHA E LSCa



FONTE: A autora (2025).

NOTA: Testemunha representa o tratamento com água purificada estéril; mancozeb foi aplicado na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o tratamento com LSCa foi feito na concentração de $210,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. As amostras retratadas são representativas das replicatas.

3.4.3.2 Ensaio *ex vivo* em frutos para inibição do patógeno *Botrytis cinerea*

Nesta etapa, foi avaliada a atividade antimicrobiana do LSCa em comparação a um fungicida usualmente empregado (mancozeb) e amostras controle, por intermédio do ensaio *ex vivo* em uvas (Figura 27). O mancozeb é um pesticida etilenobis(ditiocarbamato)s (EBDCs), sendo um composto de coordenação de manganês etilenoditiocarbamato e íons de zinco. É um fungicida multissítio com ação como inibidor enzimático inespecífico e foi selecionado para este ensaio devido ao seu amplo uso no campo, abrangendo diversos patógenos e culturas, incluindo a uva. No entanto, sua eficácia contra *Botrytis cinerea*, um patógeno comum da uva, é limitada, tornando-o uma opção menos indicada para o controle deste microrganismo. Nesses casos, é bastante comum a alternância entre diversos fungicidas, visando diminuir a resistência fúngica (Guo, B. *et al.*, 2023; Ampese; Almança, 2019; Jacometti; Wratten; Walter, 2010).

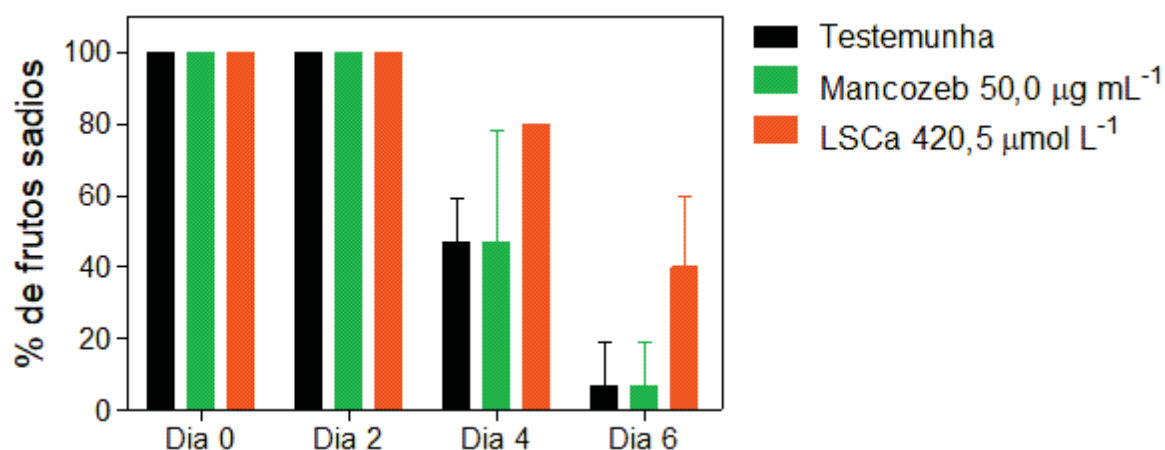
FIGURA 27 – BAGAS DE UVA HIGIENIZADAS (À ESQUERDA), DISPOSTAS EM CAIXAS GERBOX APÓS TRATAMENTO (AO CENTRO) E APÓS A CONTAMINAÇÃO COM PATÓGENOS (À DIREITA)



FONTE: A autora (2025).

A Figura 28 mostra a avaliação da proporção de frutos sadios submetidos a diferentes tratamentos ao longo de 6 dias. Observa-se que o mancozeb perde sua eficácia inibitória com o passar do tempo, enquanto o LSCa apresenta uma preservação maior dos frutos, em comparação ao fungicida extensamente empregado. A avaliação foi realizada até o 6º dia, considerando o tempo de prateleira da uva; no entanto, no 8º dia, todos os frutos apresentavam contaminação por *Botrytis cinerea*.

FIGURA 28 – ENSAIO *EX VIVO* PARA AVALIAR O APARECIMENTO DO PATÓGENO *BOTRYTIS CINEREA* EM BAGAS DE UVA UTILIZANDO OS TRATAMENTOS DA TESTEMUNHA (PRETO), FUNGICIDA (VERDE) E LIGNOSSULFONATO (LARANJA)



FONTE: A autora (2025).

Como o ensaio anterior de crescimento micelial demonstrou que o LSCa não possui atividade antifúngica frente ao *Botrytis cinerea*, sugere-se que a proteção do fruto esteja relacionada ao papel do LSCa como substrato para o crescimento do microrganismo, reduzindo sua colonização direta na superfície do fruto (Mandryk *et al.*, 2009). Os relatos de literatura acerca da interação entre ligninas e o fungo em questão estão relacionados à deposição de lignina no espessamento das paredes celulares, como um mecanismo de defesa da planta contra a infecção contra *Botrytis cinerea* (Yang *et al.*, 2018; Glazener, 1982; Lee *et al.*, 2019). Falsini e colaboradores (2023) desenvolveram uma nanocápsula de lignina e taninos para a entrega de óleo de Nemm contra *B. cinerea* em videiras; no entanto, o estudo não demonstrou capacidade de inibição do patógeno nas formulações contendo lignina isolada. Liu *et al.* (2024) desenvolveram nanopartículas de lignina para a administração sustentável de piraclostrobina para controlar doenças do morango causadas por *B. cinerea*, e, da mesma forma, não encontraram resultados promissores de inibição para a nanopartícula não carregada. Em vista disso, estudos *ex vivo* analisando o potencial de ligninas e derivados em protegerem o fruto de *Botrytis cinerea* de forma isolada são desconhecidos até o momento.

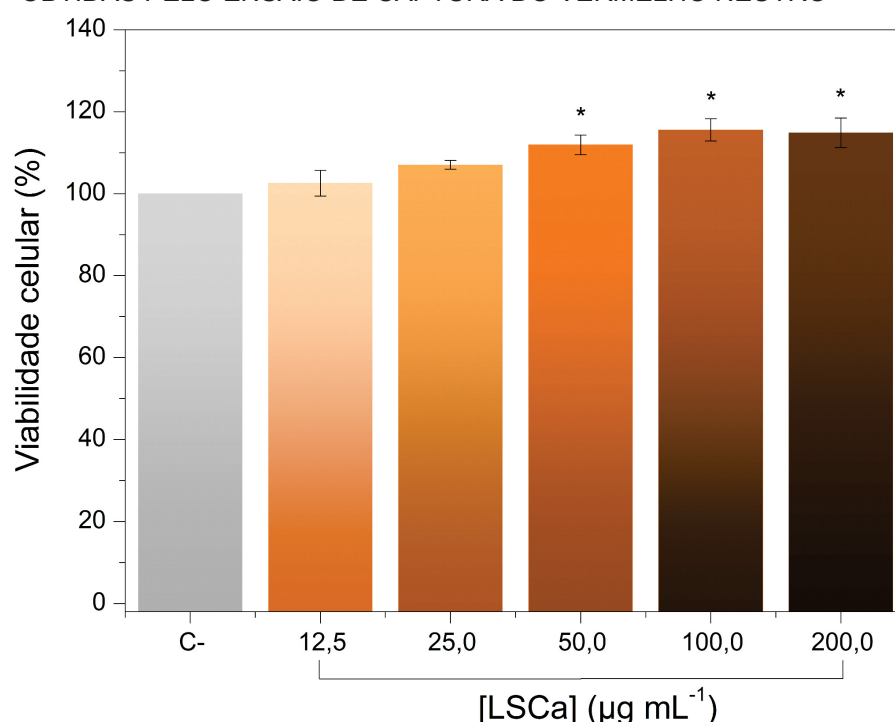
Portanto, pode-se concluir que, embora esses materiais não apresentem uma atividade antifúngica tão robusta quanto desejado, eles mantêm os frutos sadios em um nível superior ao do fungicida convencional. Esta observação é particularmente relevante, pois sugere que esse biopolímero poderia desempenhar um papel importante não apenas como agente protetor do fruto, mas também como sistema de entrega para moléculas ativas com propriedades específicas contra *Botrytis cinerea*.

Além disso, esses estudos preliminares abrem portas para os lignossulfonatos serem explorados como transportadores de agentes de controle biológico, como microrganismos benéficos, uma vez que não oferecem perigo para sua sobrevivência ou eficácia. Isso oferece novas possibilidades para o manejo integrado de doenças, combinando o uso de um biopolímero com biocontrole, o que poderia potencialmente aumentar a eficiência do tratamento e reduzir a dependência de produtos químicos sintéticos. Essa sinergia entre biotecnologia e nanomateriais oferece uma abordagem promissora para enfrentar os desafios da proteção de cultivos, promovendo uma agricultura mais equilibrada e com menores impactos à saúde humana e ao meio ambiente.

3.4.4 Determinação da citotoxicidade

O ensaio do vermelho neutro foi realizado para a determinação da quantidade de células L929 viáveis (%) após o tratamento com LSCa. Este ensaio baseia-se na capacidade das células vivas em incorporar e ligar o vermelho neutro, um corante catiônico fraco, nos lisossomos. Dessa forma, a citotoxicidade se expressa como uma redução, dependente da concentração, da absorção de vermelho neutro após a exposição ao xenobiótico ou tratamento sob investigação (Ates *et al.*, 2017; ISO, 2009). Os resultados de viabilidade celular estão expressos na Figura 29.

FIGURA 29 – VIABILIDADE CELULAR (%) DE FIBROBLASTOS L929 SEM TRATAMENTO (C-) E COM LSCa NAS CONCENTRAÇÕES DE 12,5, 25,0, 50,0, 100,0 E 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OBTIDAS PELO ENSAIO DE CAPTURA DO VERMELHO NEUTRO



FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: * representa diferença estatística quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

Nota-se, a partir da Figura 29, que o LSCa não apresenta citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, pois não houve redução de viabilidade celular. O LSCa foi avaliado nessas concentrações por serem comumente utilizadas em ensaios de citotoxicidade envolvendo nanopartículas e estruturas em escala nanométrica. Observa-se, também, que a viabilidade das células tratadas com LSCa supera os 100%, sugerindo um possível estímulo ao crescimento/proliferação celular. Outro fator que pode explicar o aumento na população de células viáveis é a

alteração no metabolismo lisossomal, aumentando a absorção do corante vermelho neutro (Repetto; Peso; Zurita, 2008). A análise estatística mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) para os grupos comparados. A diferença manifestou-se entre os grupos 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparados ao grupo controle.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular indicam que o LSCa não apresenta citotoxicidade nas concentrações testadas, sugerindo um perfil de biocompatibilidade favorável. Esses achados destacam o potencial do lignossulfonato como uma alternativa promissora para aplicações biomédicas, especialmente em sistemas que demandam materiais biocompatíveis e de baixo impacto citotóxico.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmam que os objetivos propostos foram alcançados, evidenciando a atividade do lignossulfonato de cálcio (LSCa) como surfactante e seu potencial para diversas aplicações.

O material foi purificado, sua identidade foi confirmada e suas características estruturais definidas. Os grupos funcionais foram identificados e quantificados e a massa molecular foi determinada. As análises físico-químicas demonstraram seu expressivo caráter tensoativo, reforçando sua viabilidade como um surfactante de origem vegetal. Ensaios de microscopia, SAXS e DLS possibilitaram a elucidação acerca das estruturas presentes em dispersões aquosas de LSCa, com destaque para agregados fractais e pequenos agregados cilíndricos. Além disso, a caracterização biológica indicou sua biocompatibilidade, com ausência de citotoxicidade nas concentrações avaliadas, além de um possível efeito proliferativo celular.

No contexto antimicrobiano, o LSCa demonstrou atividade significativa contra bactérias Gram-positivas, especialmente *Staphylococcus aureus*, reforçando seu potencial como um agente alternativo para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Diante da crescente resistência microbiana, a busca por compostos eficazes e sustentáveis torna-se essencial, e os lignossulfonatos se mostram como uma solução promissora. Além disso, a aplicação do LSCa na preservação pós-colheita revelou sua capacidade de prolongar a qualidade dos frutos ao atuar como um substrato alternativo para o patógeno *Botrytis cinerea*, reduzindo sua

colonização direta na superfície dos frutos. Esse efeito pode ser explorado para o desenvolvimento de revestimentos bioativos que minimizem perdas agrícolas e reduzam a dependência de fungicidas sintéticos.

Dessa forma, o lignossulfonato de cálcio apresenta-se como um material versátil, sustentável e de grande relevância para aplicações biomédicas, cosméticas e agrícolas. Seu aproveitamento como subproduto industrial reforça sua viabilidade econômica e ambiental, destacando-se como um candidato promissor na busca por alternativas renováveis e eficientes para formulações inovadoras.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, W. M. A. N. W. *et al.* Calcium lignosulfonate improves proliferation of recalcitrant indica rice callus via modulation of auxin biosynthesis and enhancement of nutrient absorption. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 161, n. 1, p. 131–142, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.046>. Acesso em: 10 fev. 2025.
- AIKEN, B. S.; LOGAN, B. E. Degradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in ammonium lignosulphonate media. **Biodegradation**, v. 7, n. 3, p. 175–182, jun. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00058177>. Acesso em: 12 fev. 2025.
- ALBERTIN, F. *et al.* *Botrytis cinerea* infection in *Vitis vinifera* cultivars under cycle inversion. **Scientia Agricola**, v. 81, e20230142, out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2023-0142>. Acesso em: 12 fev. 2025.
- ALWADANI, N.; FATEHI, P. Synthetic and lignin-based surfactants: Challenges and opportunities. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, n. 2, p. 126–138, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.07.006>. Acesso em: 12 fev. 2025.
- AMPESE, M.; ALMANÇA, M. Efeito de fungicidas no controle de *Botrytis cinerea* *in vitro* e em bagas de uva com fermento. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, v. 11, n. 1, p. 28-36, nov. 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/336999969_Efeito_de_fungicidas_no_controle_de_Botrytis_cinerea_in_vitro_e_em_bagas_de_uva_com_ferimento. Acesso em: 12 fev. 2025.
- ARO, T.; FATEHI, P. Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. **ChemSusChem**, v. 10, n. 9, p. 1861–1877, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cssc.201700082>. Acesso em: 12 fev. 2025.
- ATES, G. *et al.* Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. In: GILBERT, D.; FRIEDRICH, O. (Eds). **Cell Viability Assays - Methods and Protocols**. v. 1601. Nova Iorque: Humana Press, 2017. p. 19–26. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2. Acesso em: 12 fev. 2025.
- AYUSO-FERNÁNDEZ, I. *et al.* Peroxidase evolution in white-rot fungi follows wood lignin evolution in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 36, p. 17900–17905, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1905040116>. Acesso em: 12 fev. 2025.
- BABIJ, N. R. *et al.* NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Industrially Preferred Solvents Used in Process and Green Chemistry. **Organic Process Research & Development**, v. 20, n. 3, p. 661–667, fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00417>. Acesso em: 23 jan. 2025.

BAHRPAIMA, K.; FATEHI, P. Synthesis and Characterization of Carboxyethylated Lignosulfonate. **ChemSusChem**, v. 11, n. 17, p. 2967–2980, set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cssc.201800994>. Acesso em: 12 fev. 2025.

BARBER, M. S.; MCCONNELL, V. S.; DECAUX, B. S. Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. **Phytochemistry**, v. 54, n. 1, p. 53–56, mai. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00038-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00038-8). Acesso em: 27 jan. 2025.

BECKER, J.; WITTMANN, C. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, 107360, abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.016>. Acesso em: 10 fev. 2025.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. v. 1-2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019.

CARRASCO, J. *et al.* Influence of pH, Iron Source, and Fe/Ligand Ratio on Iron Speciation in Lignosulfonate Complexes Studied Using Mössbauer Spectroscopy. Implications on Their Fertilizer Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 13, p. 3331–3340, abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf204913s>. Acesso em: 12 fev. 2025.

CHEN, W. *et al.* Synthesis of magnetic sodium lignosulfonate hydrogel($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{LS}$) and its adsorption behavior for Cd^{2+} in wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 245, n. 1, 125498, jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125498>. Acesso em: 10 fev. 2025.

CHIQUE, J. *et al.* Foaming Properties of Lignosulfonates in the Flotation Process. **Polymers**, v. 15, n. 17, 3575, ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym15173575>. Acesso em: 12 fev. 2025.

CIRNE, L. G. A. *et al.* Impact of high-concentrate diets with cottonseed associated with calcium lignosulfonate on the metabolic, productive, and carcass characteristics of feedlot lambs. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 4, p. 1821–1832, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02194-5>. Acesso em: 10 fev. 2025.

CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **CLSI M07**: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 12. ed. Wayne, 2024. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>. Acesso em: 12 fev. 2025.

CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **CLSI M27**: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4. ed. Wayne, 2017. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/>. Acesso em: 23 jan. 2025.

CUEVA, C. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372–382, jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.006>. Acesso em: 27 jan. 2025.

DINI, S. *et al.* The Physicochemical and Functional Properties of Biosurfactants: A Review. **Molecules**, v. 29, n. 11, 2544, mai. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29112544>. Acesso em: 29 jan. 2025.

DONG, X. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1629–1634, jun. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.002>. Acesso em: 27 jan. 2025.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H. I. Detergent and skin irritation. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 15–21, jan. 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0738-081x\(95\)00103-m](https://doi.org/10.1016/0738-081x(95)00103-m). Acesso em: 10 fev. 2025.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE); INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA); INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Indústria de papel e celulose no Brasil e no mundo – panorama geral**. Rio de Janeiro: 2022. 23 p. Relatório Técnico. Disponível em: https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-650/Pulp%20and%20paper_EPE+IEA_Portugu%C3%AAs_2022_01_25_IBA.pdf. Acesso em: 10 fev. 2025.

ESPINOZA-ACOSTA, J. L. *et al.* Antioxidant, Antimicrobial, and Antimutagenic Properties of Technical Lignins and Their Applications. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 5452–5481, mar. 2016. Disponível em: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/antioxidant-antimicrobial-and-antimutagenic-properties-of-technical-lignins-and-their-applications/>. Acesso em: 27 jan. 2025.

FAIX, O. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *In*: LIN, S. Y.; DENCE, C. W. (Eds.). **Methods in Lignin Chemistry**. 1. ed. Berlin: Springer, 1992. p. 83–109. Versão Online. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_7. Acesso em: 12 fev. 2025.

FALSINI, S. *et al.* Tannins-lignin mixed nanoformulations for improving the potential of neem oil as fungicide agent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 13, p. 39131–39141, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24991-6>. Acesso em: 12 fev. 2025.

FISCHER, P.; LUTZ-BUENO, V. Glycyrrhizic acid aggregates seen from a synthetic surfactant perspective. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 26, n. 4, p. 2806–2814, dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D3CP04835G>. Acesso em: 10 fev. 2025.

FREDHEIM, G. E.; BRAATEN, S. M.; CHRISTENSEN, B. E. Molecular weight determination of lignosulfonates by size-exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering. **Journal of Chromatography A**, v. 942, n. 1–2, p. 191–199, jan. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01377-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01377-2). Acesso em: 23 jan. 2025.

FU, T. *et al.* A Novel Nano-Spherical Tip for Improving Precision in Elastic Modulus Measurements of Polymer Materials via Atomic Force Microscopy. **Micromachines**, v. 15, n. 9, p. 1175, set. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/mi15091175>. Acesso em: 10 mar. 2025.

GAO, S. *et al.* Unexpected role of amphiphilic lignosulfonate to improve the storage stability of urea formaldehyde resin and its application as adhesives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, n. 1, p. 755–762, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.135>. Acesso em: 9 fev. 2025.

GE, Y.; LI, D.; LI, Z. Effects of Lignosulfonate Structure on the Surface Activity and Wettability to a Hydrophobic Powder. **BioResources**, v. 9, n. 4, p. 7119–7127, out. 2014. Disponível em: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/effects-of-lignosulfonate-structure-on-the-surface-activity-and-wettability-to-a-hydrophobic-powder/>. Acesso em: 12 fev. 2025.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small Angle X-ray Scattering**. Londres: Academic Press, 1982.

GLAZENER, J. A. Accumulation of phenolic compounds in cells and formation of lignin-like polymers in cell walls of young tomato fruits after inoculation with *Botrytis cinerea*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 11–25, jan. 1982. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(82\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90019-4). Acesso em: 29 jan. 2025.

GORDOBIL, O. *et al.* Potential use of kraft and organosolv lignins as a natural additive for healthcare products. **RSC Advances**, v. 8, n. 43, p. 24525–24533, jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C8RA02255K>. Acesso em: 27 jan. 2025.

GORDTS, S. C. *et al.* The Low-Cost Compound Lignosulfonic Acid (LA) Exhibits Broad-Spectrum Anti-HIV and Anti-HSV Activity and Has Potential for Microbicidal Applications. **PLoS One**, v. 10, n. 7, e0131219, jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131219>. Acesso em: 8 fev. 2025.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by "HLB". **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, n. 5, p. 311–325, 1949. Disponível em: <https://library.scconline.org/v001n05/8>. Acesso em: 12 fev. 2025.

GUNDERSEN, S. A.; SÆTHER, Ø.; SJÖBLOM, J. Salt effects on lignosulfonate and Kraft lignin stabilized O/W-emulsions studied by means of electrical conductivity and video-enhanced microscopy. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 186, n. 3, p. 141–153, ago. 2001. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00541-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00541-0). Acesso em: 9 fev. 2025.

GUO, B. *et al.* Interaction between Six Waxy Components in Summer Black Grapes (*Vitis vinifera*) and Mancozeb and Its Effect on the Residue of Mancozeb. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, 7705, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24097705>. Acesso em: 26 jan. 2025.

GUO, Y. *et al.* Facile preparation of cellulose/lignosulfonate derivatives composite films with high UV-shielding and gas barrier properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 237, n. 1, 124218, mai. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124218>. Acesso em: 10/2/2025.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry, Revised and Expanded**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781315274287>. Acesso em: 12 fev. 2025.

HONG, N.; QIU, X. Structure–Adsorption Behavior–Dispersion Property Relationship of Alkyl Chain Cross-Linked Lignosulfonate with Different Molecular Weights. **ACS Omega**, v. 5, n. 10, p. 4836–4843, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03535>. Acesso em: 11 fev. 2025.

HSIAO, P.-Y. Chain Morphology, Swelling Exponent, Persistence Length, Like-Charge Attraction, and Charge Distribution around a Chain in Polyelectrolyte Solutions: Effects of Salt Concentration and Ion Size Studied by Molecular Dynamics Simulations. **Macromolecules**, v. 39, n. 20, p. 7125–7137, set. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ma0609782>. Acesso em: 12 fev. 2025.

ILES, B. **Estabilização de emulsões utilizando lignossulfonato: uma abordagem sustentável no carreamento do praziquantel**. 2025. 86 f. Tese (Doutorado, Nanociências e Nanobiotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2025. Em processo de defesa e publicação.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity**. Genebra, 2009. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/36406.html>. Acesso em: 27 jan. 2025.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Compendium of chemical terminology – Gold Book**. 2. ed. Hoboken: Wiley–Blackwell, 1997. Versão *Online*. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/goldbook>. Acesso em: 12 fev. 2025.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497–4559, mai. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>. Acesso em: 29 jan. 2025.

JACOMETTI, M. A.; WRATTEN, S. D.; WALTER, M. Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, n. 1, p. 154–172, fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.0067.x>. Acesso em: 26 jan. 2025.

JAHAN, R. *et al.* Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, 102061, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>. Acesso em: 29 jan. 2025.

JHA, A.; KUMAR, A. Deciphering the role of Sodium Lignosulfonate against *Candida* spp. as persuasive anticandidal agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. 1, p. 1212–1219, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.102>. Acesso em: 27 jan. 2025.

JHA, A.; KUMAR, A. Sodium lignosulfonate causes cell membrane perturbation in the human fungal pathogen *Candida albicans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 6, 164, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03609-0>. Acesso em 12 fev. 2025.

JOHNSON, P. *et al.* Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, n. 1, 102340, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102340>. Acesso em: 10 fev. 2025.

KARAGOZ, P. *et al.* Pharmaceutical applications of lignin-derived chemicals and lignin-based materials: linking lignin source and processing with clinical indication. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 14, n. 21, p. 26553–26574, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03745-5>. Acesso em: 10 fev. 2025.

KARUNARATHNA, M. S.; SMITH, R. C. Valorization of Lignin as a Sustainable Component of Structural Materials and Composites: Advances from 2011 to 2019. **Sustainability**, v. 12, n. 2, 734, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su12020734>. Acesso em: 12 fev. 2025.

KIM, S. *et al.* Chitosan–lignosulfonates sono-chemically prepared nanoparticles: Characterisation and potential applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, n. 1, p. 1–8, mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.033>. Acesso em: 8 fev. 2025.

KOK, A. D.-X. *et al.* Sodium lignosulfonate improves shoot growth of *Oryza sativa* via enhancement of photosynthetic activity and reduced accumulation of reactive oxygen species. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 13226, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92401-x>. Acesso em: 10 fev. 2025.

LAUTEN, R. A.; MYRVOLD, B. O.; GUNDERSEN, S. A. New developments in the commercial utilization of lignosulfonates. In: KJELLIN, M.; JOHANSSON, I (Eds.). **Surfactants from Renewable Resources**. 1. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. p. 269-283. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470686607.ch14>. Acesso em: 8 fev. 2025.

LEE, M.-H. *et al.* Lignin-based barrier restricts pathogens to the infection site and confers resistance in plants. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 23, e101948, dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/emboj.2019101948>. Acesso em: 29 jan. 2025.

LEE, S. C. *et al.* Preparation and Application of Light-Colored Lignin Nanoparticles for Broad-Spectrum Sunscreens. **Polymers**, v. 12, n. 3, 699, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym12030699>. Acesso em: 24 jan. 2025.

LEW, J. H. *et al.* Atomic Force Microscopy of Hydrolysed Polyacrylamide Adsorption onto Calcium Carbonate. **Polymers**, v. 15, n. 20, p. 4037, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym15204037>. Acesso em: 10 mar, 2025.

LI, H.; PENG, L. Antimicrobial and antioxidant surface modification of cellulose fibers using layer-by-layer deposition of chitosan and lignosulfonates. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, n. 1, p. 35–42, jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.071>. Acesso em: 10 fev. 2025.

LI, Z. *et al.* Adsorption of different molecular weight lignosulfonates on dimethomorph powder in an aqueous system. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 532–537, jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.11.069>. Acesso em: 12 fev. 2025.

LIU, J. *et al.* Green synthesized lignin nanoparticles for the sustainable delivery of pyraclostrobin to control strawberry diseases caused by *Botrytis cinerea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 274, n. 2, 133488, ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133488>. Acesso em: 29 jan. 2025.

LIU, H. *et al.* Layer-by-layer assembly of lignosulfonates for hydrophilic surface modification. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 287–291, set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.05.006>. Acesso em: 12 fev. 2025.

LIU, L. *et al.* Simultaneously separation of xylo-oligosaccharide and lignosulfonate from wheat straw magnesium bisulfite pretreatment spent liquor using ion exchange resin. **Bioresource Technology**, v. 249, n. 1, p. 189–195, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.207>. Acesso em: 27 jan. 2025.

LORQUIN, F. *et al.* Lignosulfonate is an efficient SPF booster: Application to eco-friendly sunscreen formulations. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 24, n. 1, 100539, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100539>. Acesso em: 8 fev. 2025.

LUGOVITSKAYA, T. N.; KOLMACHIKHINA, E. B. Associative Behavior of Lignosulphonates in Moderately Concentrated Water, Water–Salt, and Water–Alcoholic Media. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 8, p. 3323–3331, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00441>. Acesso em: 12 fev. 2025.

LUGOVITSKAYA, T. N.; NABOYCHENKO, S. S. Lignosulfonates as charge carriers and precursors for the synthesis of nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 602, n. 1, 125127, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125127>. Acesso em: 12 fev. 2025.

LUGOVITSKAYA, T.; ROGOZHNIKOV, D. Surface Phenomena with the Participation of Sulfite Lignin under Pressure Leaching of Sulfide Materials. **Langmuir**, v. 39, n. 16, p. 5738–5751, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c03481>. Acesso em: 10 fev. 2025.

LUTNAES, B. F. *et al.* ^1H and ^{13}C NMR data of benzylsulfonic acids—model compounds for lignosulfonate. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 299–305, mar. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrc.2184>. Acesso em: 11 fev. 2025.

MAGINA, S.; BARROS-TIMMONS, A.; EVTUGUIN, D. V. Synthesis of Lignosulfonate-Based Dispersants for Application in Concrete Formulations. **Materials**, v. 14, n. 23, 7388, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma14237388>. Acesso em: 10 fev. 2025.

MANAARGADOO-CATIN, M. *et al.* Hemolysis by surfactants — A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, n. 1, p. 1–16, fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.10.011>. Acesso em: 29 jan. 2025.

MANDRYK, M. N. *et al.* Sludge and lignin as growth media for the production of antimicrobial substances by selected microorganisms. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, v. 42, n. 8, p. 783–795, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/032354007014532530>. Acesso em: 29 jan. 2025.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants?. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 9, p. 1597–1605, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0956-x>. Acesso em: 12 fev. 2025.

MAZIERO, P. *et al.* Structural features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 61–69, jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.008>. Acesso em: 12 fev. 2025.

MOTIN, M. A.; MIA, M. A. H.; ISLAM, A. K. M. N. Thermodynamic properties of Sodium Dodecyl Sulfate aqueous solutions with Methanol, Ethanol, n-Propanol and iso-Propanol at different temperatures. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 2, p. 172–180, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.01.009>. Acesso em: 12 fev. 2025.

MUSL, O. *et al.* Mapping of the Hydrophobic Composition of Lignosulfonates. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 49, p. 16786–16795, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06469>. Acesso em: 11 fev. 2025.

NGUYEN, M.-H.; HWANG, I.-C.; PARK, H.-J. Enhanced photoprotection for photo-labile compounds using double-layer coated corn oil-nanoemulsions with chitosan and lignosulfonate. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 125, n. 1, p. 194–201, ago. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.06.009>. Acesso em: 9 fev. 2025.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 119–146, jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>. Acesso em: 27 jan. 2025.

NORGREN, M.; EDLUND, H.; WÄGBERG, L. Aggregation of Lignin Derivatives under Alkaline Conditions. Kinetics and Aggregate Structure. **Langmuir**, v. 18, n. 7, p. 2859–2865, fev. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la011627d>. Acesso em: 12 fev. 2025.

NÚÑEZ-FLORES, R. *et al.* Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 60–71, mai. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.015>. Acesso em: 8 fev. 2025.

OMARI, A. *et al.* A comprehensive review of recent advances on surfactant architectures and their applications for unconventional reservoirs. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 206, n. 1, 109025, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.109025>. Acesso em: 29 jan. 2025.

OUYANG, X. *et al.* Adsorption Characteristics of Lignosulfonates in Salt-Free and Salt-Added Aqueous Solutions. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3313–3320, set 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm200808p>. Acesso em: 11 fev. 2025.

PERKINS, W. S. Surfactants - A Primer, an Indepth Discussion of the Behaviour of Common Types of Surfactants. *In*: PERKINS, W. S. **Dyeing, Printing and Finishing**. 1. ed. ATI, 1998. p. 51-53.

PRADHAN, A.; BHATTACHARYYA, A. Quest for an eco-friendly alternative surfactant: Surface and foam characteristics of natural surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v. 150, n. 1, p. 127–134, mai. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.013>. Acesso em: 10 fev. 2025.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 1. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1973.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975.

QIAN, Y. *et al.* Light scattering characterization of lignosulfonate structure in saline solutions. **Holzforschung**, v. 69, n. 4, p. 377–383, out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hf-2014-0105>. Acesso em: 12 fev. 2025.

QIU, X. *et al.* Aggregation Behavior of Sodium Lignosulfonate in Water Solution. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 48, p. 15857–15861, dez. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp107036m>. Acesso em: 12 fev. 2025.

QIU, X. *et al.* Effect of straight-chain alcohols on the physicochemical properties of calcium lignosulfonate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 1, p. 151–155, out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.05.072>. Acesso em: 12 fev. 2025.

REPETTO, G.; PESO, A. D.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, jun. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>. Acesso em: 27 jan. 2025.

REYES, D. C.; MA, Z.; ROMERO, J. J. The Antimicrobial Properties of Technical Lignins and Their Derivatives—A Review. **Polymers**, v. 16, n. 15, 2181, jul. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym16152181>. Acesso em: 12 fev. 2025.

RÖNNANDER, J.; WRIGHT, S. A. I. Growth of wood-inhabiting yeasts of the Faroe Islands in the presence of spent sulphite liquor. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 114, n. 6, p. 649–666, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01543-5>. Acesso em: 12 fev. 2025.

RUWOLDT, J. A Critical Review of the Physicochemical Properties of Lignosulfonates: Chemical Structure and Behavior in Aqueous Solution, at Surfaces and Interfaces. **Surfaces**, v. 3, n. 4, p. 622–648, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/surfaces3040042>. Acesso em: 9 fev. 2025.

RUWOLDT, J.; BLINDHEIM, F. H.; CHINGA-CARRASCO, G. Functional surfaces, films, and coatings with lignin – a critical review. **RSC Advances**, v. 13, n. 18, p. 12529–12553, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d2ra08179b>. Acesso em: 12 fev. 2025.

RUWOLDT, J. *et al.* Interfacial Adsorption of Oil-Soluble Kraft Lignin and Stabilization of Water-in-Oil Emulsions. **Langmuir**, v. 40, n. 10, p. 5409–5419, mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c03950>. Acesso em: 9 fev. 2025.

RUWOLDT, J.; ØYE, G. Effect of Low-Molecular-Weight Alcohols on Emulsion Stabilization with Lignosulfonates. **ACS Omega**, v. 5, n. 46, p. 30168–30175, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04650>. Acesso em: 9 fev. 2025.

RUWOLDT, J.; PLANQUE, J.; ØYE, G. Lignosulfonate Salt Tolerance and the Effect on Emulsion Stability. **ACS Omega**, v. 5, n. 25, p. 15007–15015, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00616>. Acesso em: 10 fev. 2025.

RUWOLDT, J.; SIMON, S.; ØYE, G. Viscoelastic properties of interfacial lignosulfonate films and the effect of added electrolytes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 606, n. 1, 125478, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125478>. Acesso em: 9 fev. 2025.

SALINAS, S. R. A. Einstein e a teoria do movimento browniano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 27, n. 2, p. 263–269, jun. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-11172005000200013>. Acesso em: 12 fev. 2025.

SAVY, D. *et al.* Replacing calcium with ammonium counterion in lignosulfonates from paper mills affects their molecular properties and bioactivity. **Science of The Total Environment**, v. 645, n. 1, p. 411–418, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.153>. Acesso em: 12 fev. 2025.

SEIXAS-JUNIOR, C. H. *et al.* Interaction of guar gum galactomannans with the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165(A), n. 1, p. 713–721, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.216>. Acesso em: 23 jan. 2025.

SGARZI, M. *et al.* Simple Strategies to Modulate the pH-Responsiveness of Lignosulfonate-Based Delivery Systems. **Materials**, v. 15, n. 5, 1857, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma15051857>. Acesso em: 29 jan. 2025.

SHABAN, S. M.; KANG, J.; KIM, D.-H. Surfactants: Recent advances and their applications. **Composites Communications**, v. 22, n. 1, 100537, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.100537>. Acesso em: 29 jan. 2025.

SUGIARTO, S. *et al.* How far is Lignin from being a biomedical material? **Bioactive Materials**, v. 8, n. 1, p. 71–94, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.023>. Acesso em: 27 jan. 2025.

SUOTA, M. J. *et al.* Chemical and structural characterization of hardwood and softwood LignoForce™ lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 173, n. 1, 114138, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114138>. Acesso em: 12 fev. 2025.

TANG, Q. *et al.* Preparation of polyether amine-bridged lignosulfonate for utilization as a nano dye dispersant. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222(B), n. 1, p. 2523–2534, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.036>. Acesso em: 10 fev. 2025.

TARDY, B. L. *et al.* Prospects for the integration of lignin materials into the circular economy. **Materials Today**, v. 65, n. 1, p. 122–132, mai. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2023.04.001>. Acesso em: 10 fev. 2025.

TEIXEIRA, J. Experimental Methods for Studying Fractal Aggregates. *In*: STANLEY, H. E.; OSTROWSKY, N. (Eds.). **On Growth and Form: Fractal and Non-Fractal Patterns in Physics**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 1986. p.145–162.

VAINIO, U. *et al.* Distribution of Counterions around Lignosulfonate Macromolecules in Different Polar Solvent Mixtures. **Langmuir**, v. 28, n. 5, p. 2465–2475, fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la204479d>. Acesso em: 8 fev. 2025.

VAINIO, U.; LAUTEN, R. A.; SERIMAA, R. Small-Angle X-ray Scattering and Rheological Characterization of Aqueous Lignosulfonate Solutions. **Langmuir**, v. 24, n. 15, p. 7735–7743, ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la800479k>. Acesso em: 12 fev. 2025.

VERRILLO, M. *et al.* Valorization of lignins from energy crops and agro-industrial byproducts as antioxidant and antibacterial materials. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 7, p. 2885–2892, mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11629>. Acesso em: 27 jan. 2025.

VILLOTA-PAZ, J. M.; OSORIO-TEJADA, J. L.; MORALES-PINZÓN, T. Comparative life cycle assessment for the manufacture of bio-detergents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 12, p. 34243–34254, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24439-x>. Acesso em: 10 fev. 2025.

WANG, L. *et al.* Novel hierarchical carbon microspheres@layered double hydroxides@copper lignosulfonate architecture for polypropylene with enhanced flame retardant and mechanical performances. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 235, n. 1, 123726, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123726>. Acesso em: 10 fev. 2025.

WEXLER, A. S. Characterization of Lignosulfonates by Ultraviolet Spectrometry. Direct and Difference Spectrograms. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 213–221, jan. 1964. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60207a066>. Acesso em: 23 jan. 2025.

XU, C.; FERDOSIAN, F. **Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials**. Berlim: Springer, 2017. Versão *Online*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54959-9>. Acesso em: 12 fev. 2025.

YAN, M. *et al.* Influence of pH on the behavior of lignosulfonate macromolecules in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 371, n. 1–3, p. 50–58, nov. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.08.062>. Acesso em: 12 fev. 2025.

YANG, C. *et al.* Lignin metabolism involves *Botrytis cinerea* BcGs1- induced defense response in tomato. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, 103, jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1319-0>. Acesso em: 29 jan. 2025.

ZHANG, A. *et al.* Preparation of Light-Colored Lignosulfonate Sunscreen Microcapsules with Strengthened UV-Blocking and Adhesion Performance. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 10, n. 29, p. 9381–9388, jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01487>. Acesso em: 8 fev. 2025.

ZHANG, X. *et al.* Determination of the Structures of Lignin Subunits and Nanoparticles in Solution by Small-Angle Neutron Scattering: Towards Improving Lignin Valorization. **ChemSusChem**, v. 15, n. 19, e202201230, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cssc.202201230>. Acesso em: 12 fev. 2025.

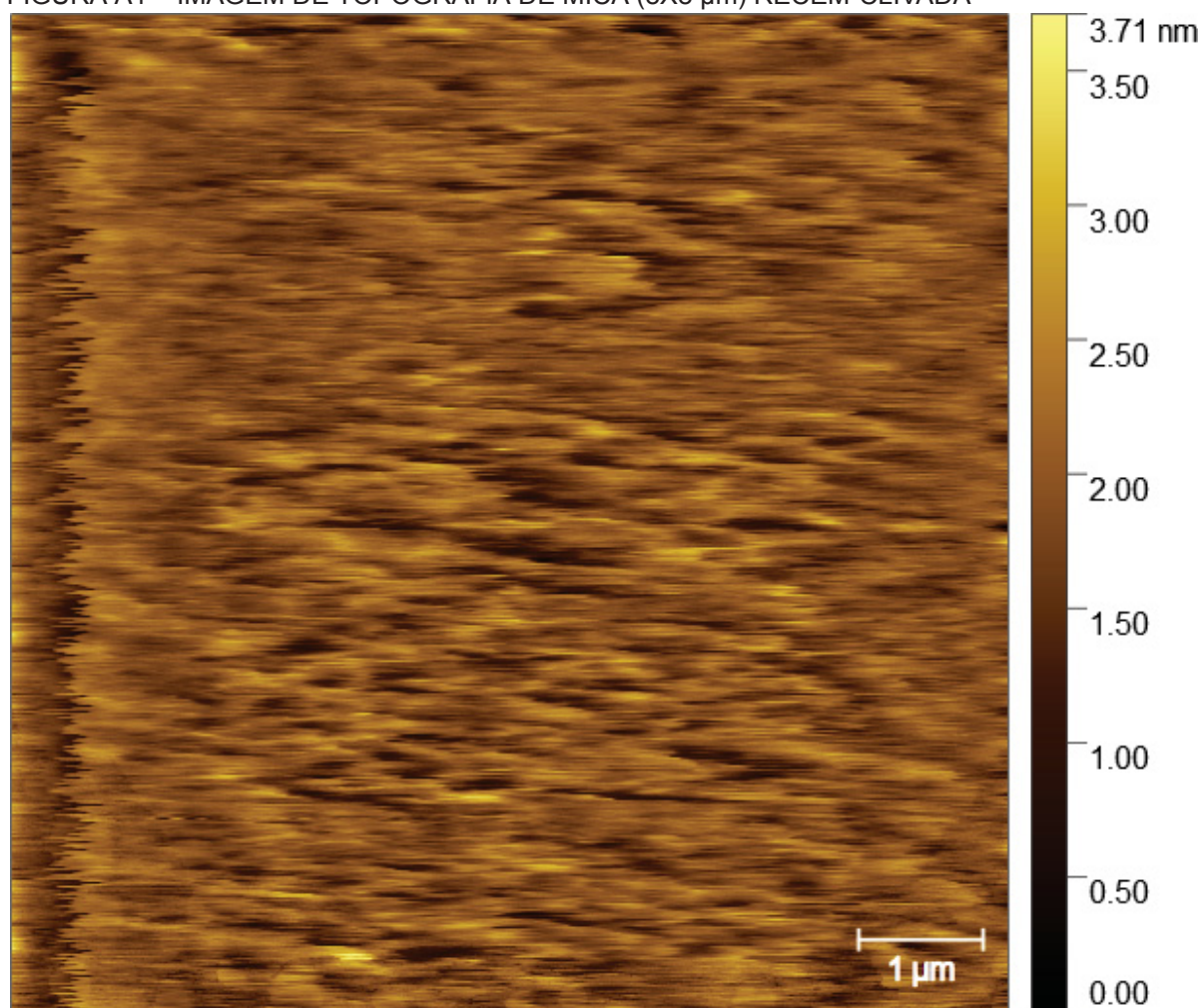
ZHOU, H. *et al.* Physicochemical properties of sodium lignosulfonates (NaLS) modified by laccase. **Holzforschung**, v. 66, n. 7, p. 825–832, abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hf-2011-0189>. Acesso em: 12 fev. 2025.

ZINOVYEV, G. *et al.* Getting Closer to Absolute Molar Masses of Technical Lignins. **ChemSusChem**, v. 11, n. 18, p. 3259–3268, set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cssc.201801177>. Acesso em: 11 fev. 2025.

ZOU, Q.; WANG, W.; WANG, X. Modification mechanism of calcium lignosulfonate on cementing cement. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 7558, mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58077-9>. Acesso em: 10 fev. 2025.

APÊNDICE A – IMAGEM DE TOPOGRAFIA DE MICA (8X8 μm) RECÉM-CLIVADA

FIGURA A1 – IMAGEM DE TOPOGRAFIA DE MICA (8X8 μm) RECÉM-CLIVADA



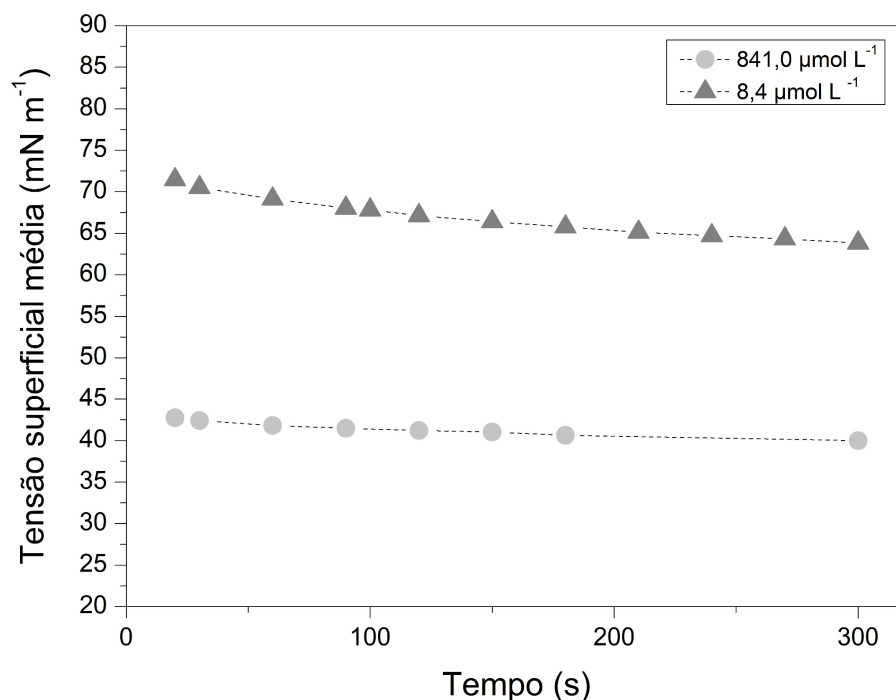
FONTE: A autora (2025).

APÊNDICE B – DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS IMPORTANTES AO DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE TENSIOMETRIA

Durante as análises, percebeu-se que a tensão superficial da gota pendente variava de acordo com o tempo de análise, especialmente em concentrações de polímero menores. As análises iniciais foram realizadas considerando-se um tempo de 20 segundos entre a dispensação da gota e a medição da tensão. No entanto, notou-se que as moléculas levam um tempo específico para migrarem para a interface líquido/vapor e estabelecerem um equilíbrio. A fim de se determinar um tempo de análise adequado e coerente, analisou-se a tensão superficial pelo *tracking mode* e pelo realizou-se o cálculo da migração de uma molécula do centro da gota até a interface.

Na Figura B1 é possível notar o efeito do tempo na migração e reorganização das moléculas na gota pendente. As análises foram realizadas até os 300 segundos, pois após esse tempo a gota perde massa por desidratação, mesmo em ambiente com saturação de umidade. Percebe-se, no gráfico da Figura B1, que a maior variação de tensão superficial encontra-se na menor concentração, fato que pode ser explicado pela menor quantidade de moléculas em solução, sua movimentação e organização na interface, até atingir um equilíbrio. Nessa concentração, a tensão variou de 71,44 a 63,82 mN m⁻¹ e o ponto médio da variação ficou localizado entre 90-100 segundos. Em vista do exposto, definiu-se 90 s como tempo padrão de análise, para possibilitar que o LSCa, em qualquer concentração, pudesse ter um tempo adequado de migração e uma leitura de tensão superficial mais apropriada.

FIGURA B1 – ANÁLISE DE TENSÃO SUPERFICIAL LÍQUIDO/VAPOR EM FUNÇÃO DO TEMPO (*TRACKING MODE*) EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE LIGNOSULFONATO DE CÁLCIO PURIFICADO



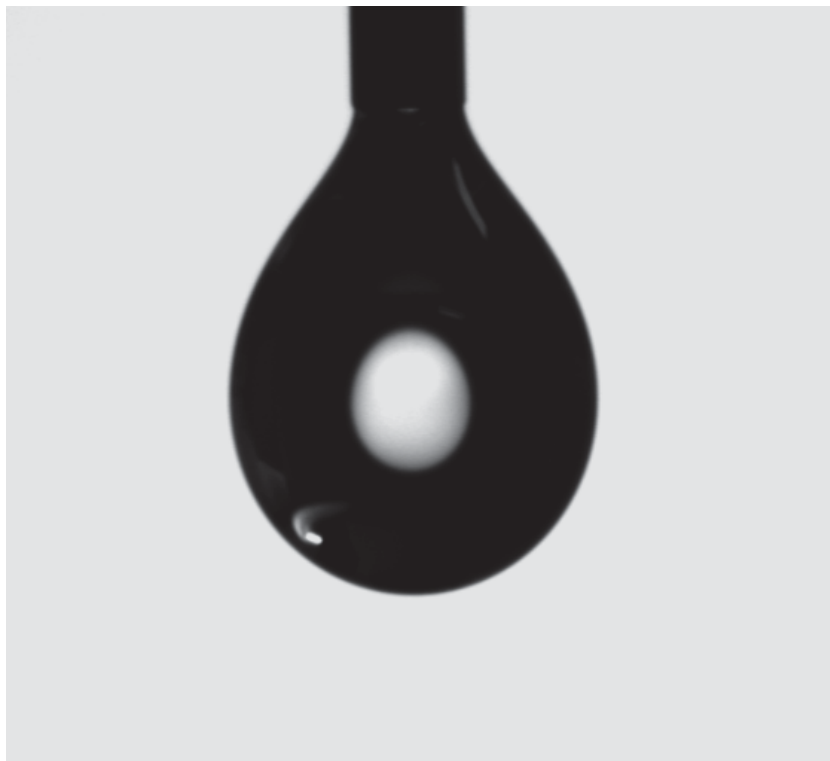
FONTE: A autora (2025).

O cálculo da migração das moléculas foi realizado de acordo com a equação do percurso quadrático médio (SALINAS, 2005), em que x^2 é o percurso quadrático médio, D é o coeficiente de difusão da molécula e t é o tempo percorrido:

$$(x^2) = 2Dt$$

A partir de um coeficiente de difusão de $1,320 \pm 0,439 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, obtido por DLS, e um percurso de 1,4405 mm (raio da gota pendente, Figura B2), foi possível obter o tempo de 0,79 segundos. Constata-se, de acordo com o discutido anteriormente, que, apesar do tempo curto de migração, o equilíbrio demora mais tempo a acontecer, provavelmente por uma reorganização das moléculas na interface. Portanto, manteve-se o tempo de análise de 90 segundos.

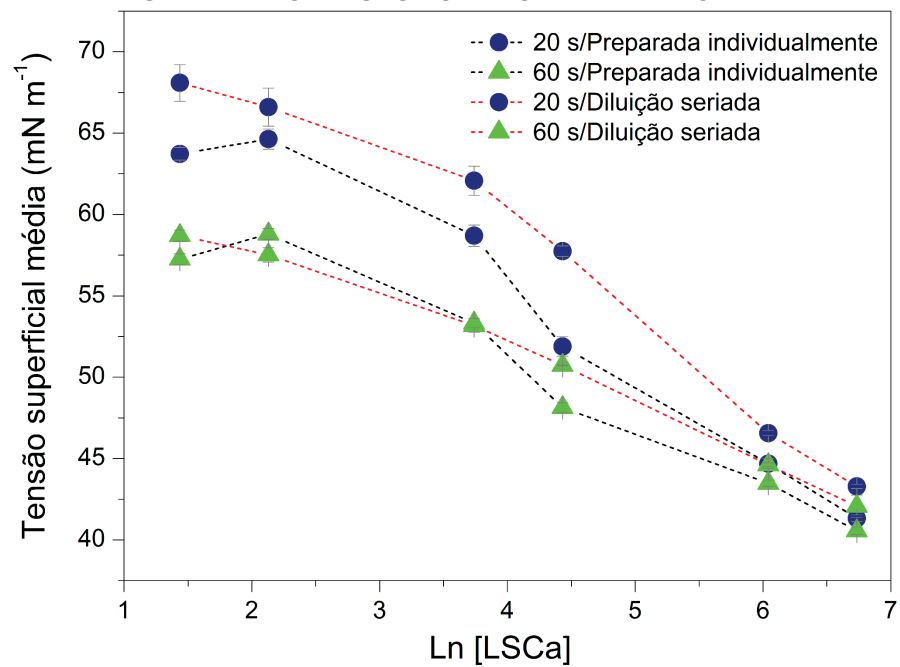
FIGURA B2 – IMAGEM DE GOTA PENDENTE DE DISPERSÃO DILUÍDA DO LSCa



FONTE: A autora (2025).

Outro parâmetro testado na análise de tensiometria foi o modo de preparação das amostras (Figura B3). As concentrações de LSCa foram preparadas na forma de diluição seriada e, também, preparadas individualmente. Nesse contexto, os agregados formados em concentrações maiores poderiam ter suas estruturas mantidas ao longo da diluição seriada, criando uma medição incoerente da tensão. A leitura de tensão superficial permaneceu semelhante, indicando que os agregados formados em concentrações maiores são reversíveis quando diluídos. Dessa maneira, todos os resultados demonstrados neste tópico representam a análise com amostras preparadas em diluição seriada.

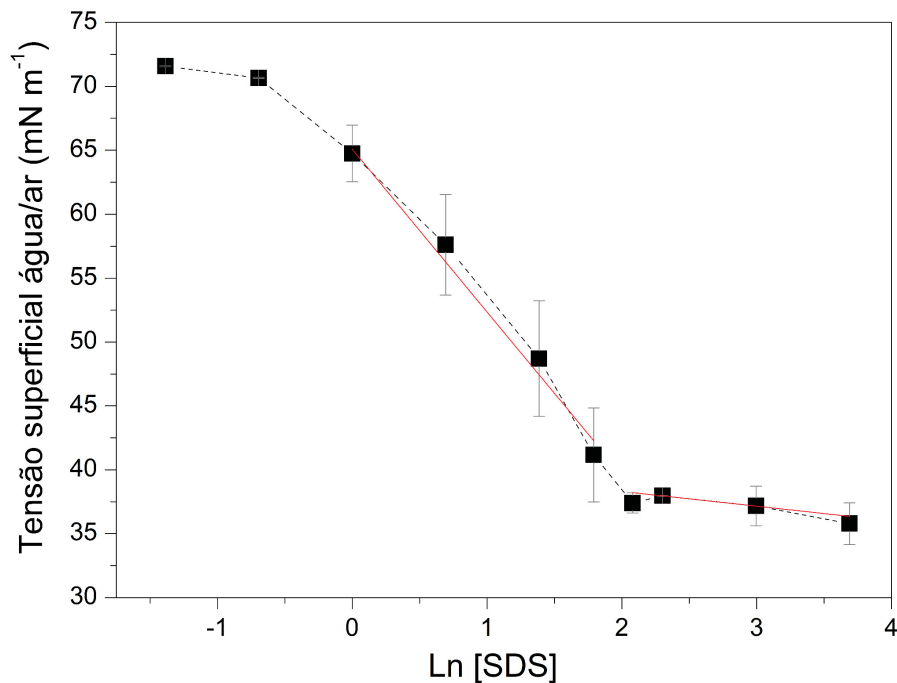
FIGURA B3 – ANÁLISE DE TENSÃO SUPERFICIAL LÍQUIDO/VAPOR CONSIDERANDO DUAS VARIÁVEIS DE TEMPO E DUAS FORMAS DE PREPARO



FONTE: A autora (2025).

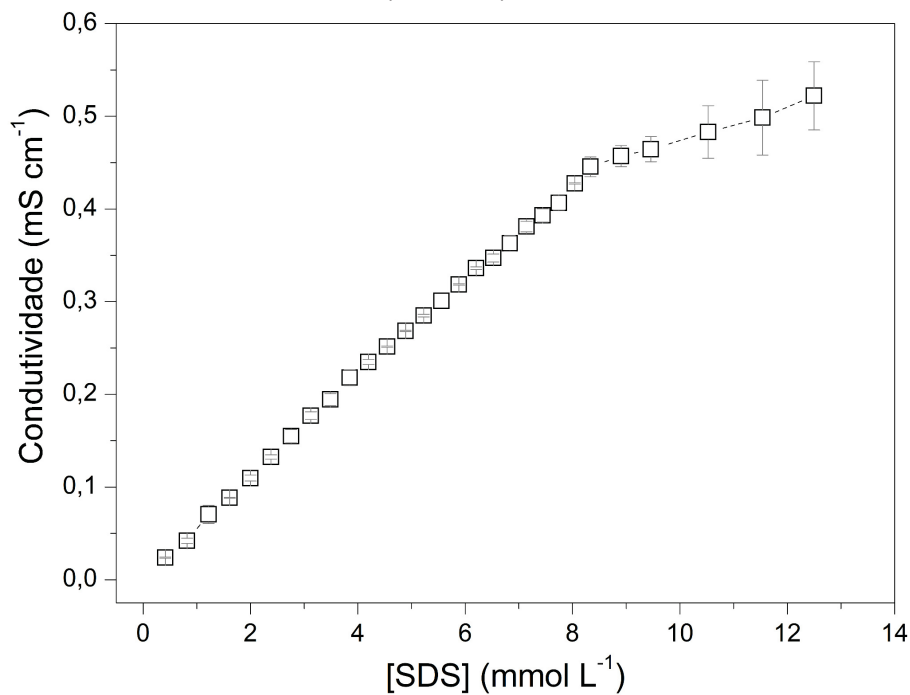
APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS)

FIGURA C1 – ISOTERMA DE GIBBS DO SDS EM INTERFACE ÁGUA/AR, A 20 °C (293,15 K)



FONTE: A autora (2025).

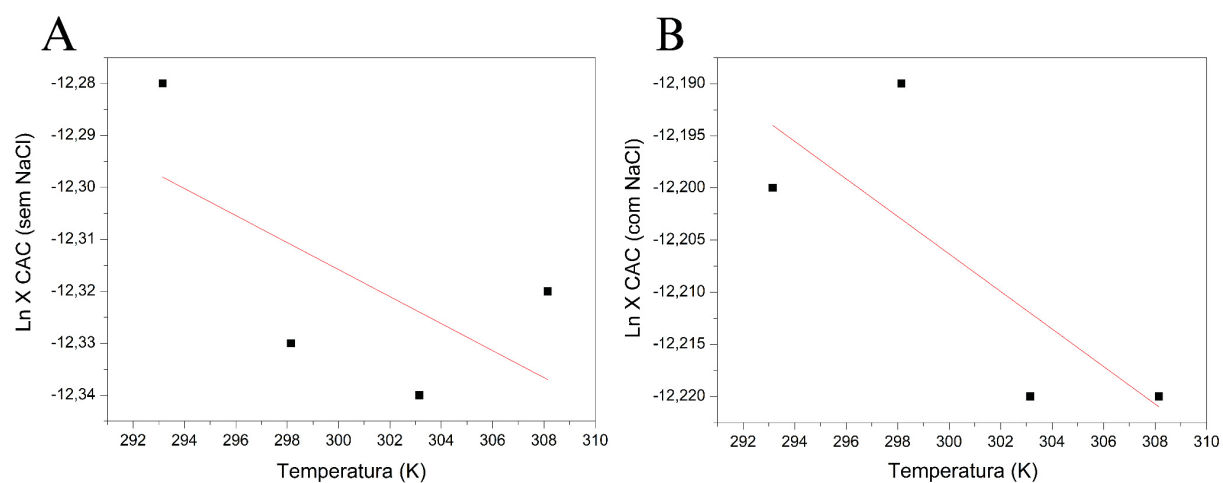
FIGURA C2 – TITULAÇÃO CONDUTIMÉTRICA DO SDS CONCENTRADO EM ÁGUA ULTRAPURIFICADA, A 20 °C (293,15 K)



FONTE: A autora (2025).

APÊNDICE D – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE $\ln X_{CAC}$ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (K)

FIGURA D1 – GRÁFICOS $\ln X_{CAC}$ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (K)

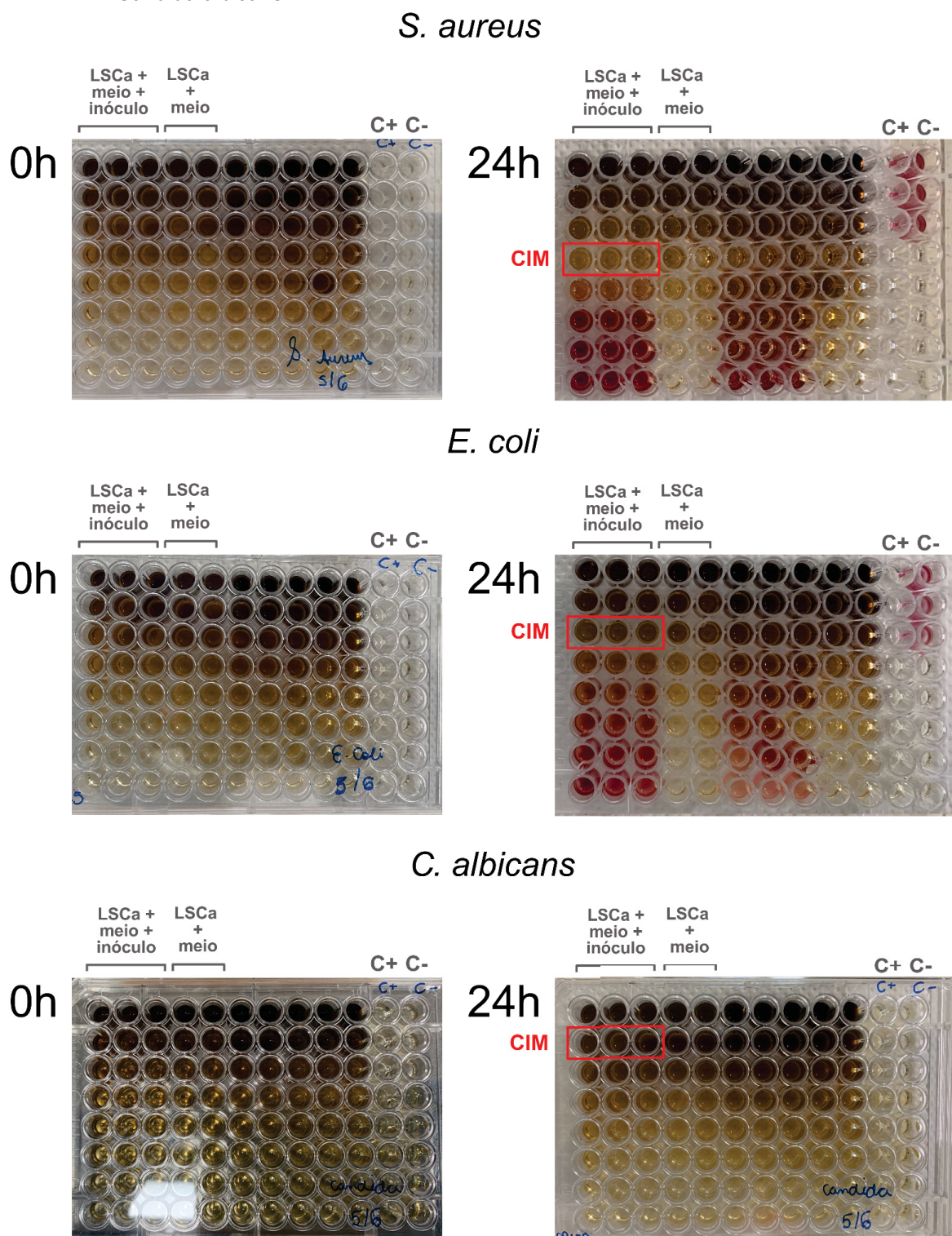


FONTE: A autora (2025).

LEGENDA: *A* representa os valores com base na titulação em água ultrapurificada e *B* representa os valores com base na titulação em ambiente de força iônica constante.

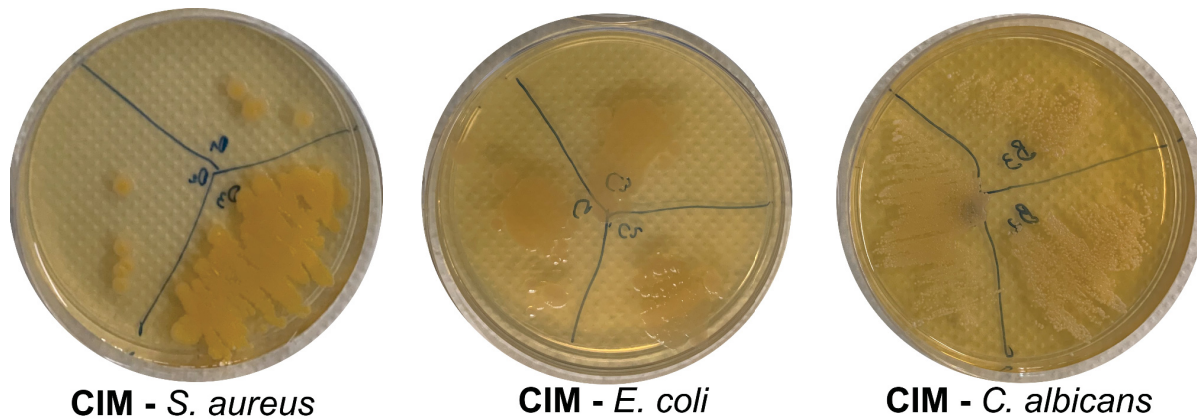
APÊNDICE E – AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS: IMAGENS COMPLEMENTARES

FIGURA E1 – ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO LSCa CONTRA OS MICRORGANISMOS *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* E *Candida albicans*



FONTE: A autora (2025).

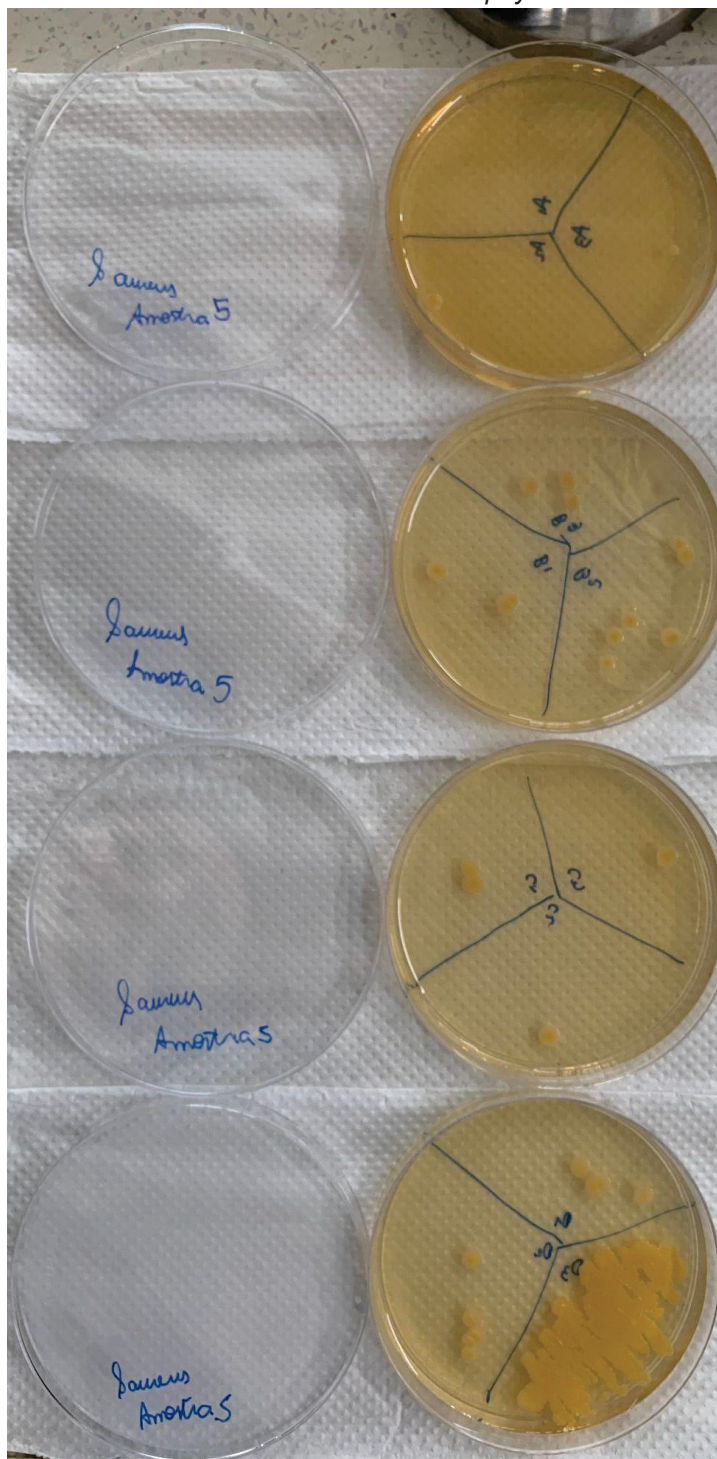
FIGURA E2 – ENSAIO PARA DETERMINAR AS ATIVIDADES BACTERICIDAS/
BACTERIOSTÁTICAS OU FUNGICIDAS/FUNGISTÁTICAS DO LSCa CONTRA OS
MICRORGANISMOS *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* E
Candida albicans



FONTE: A autora (2025).

NOTA: A divisão da placa em três partes representa o plaqueamento de cada poço da triplicata na CIM.

FIGURA E3 – ENSAIO PARA DETERMINAR A ATIVIDADE BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICA DO LSCa CONTRA O MICRORGANISMO *Staphylococcus aureus*



FONTE: A autora (2025).

NOTA: A divisão da placa em três partes representa o plaqueamento de cada poço da triplicata na CIM. A primeira placa representa o plaqueamento do poço A ($25,0 \text{ mg mL}^{-1}/210,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$); a segunda, do poço B ($12,5 \text{ mg mL}^{-1}/105,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$); a terceira, do poço C ($6,3 \text{ mg mL}^{-1}/53,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$); e a quarta, do poço D ($3,1 \text{ mg mL}^{-1}/26,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).