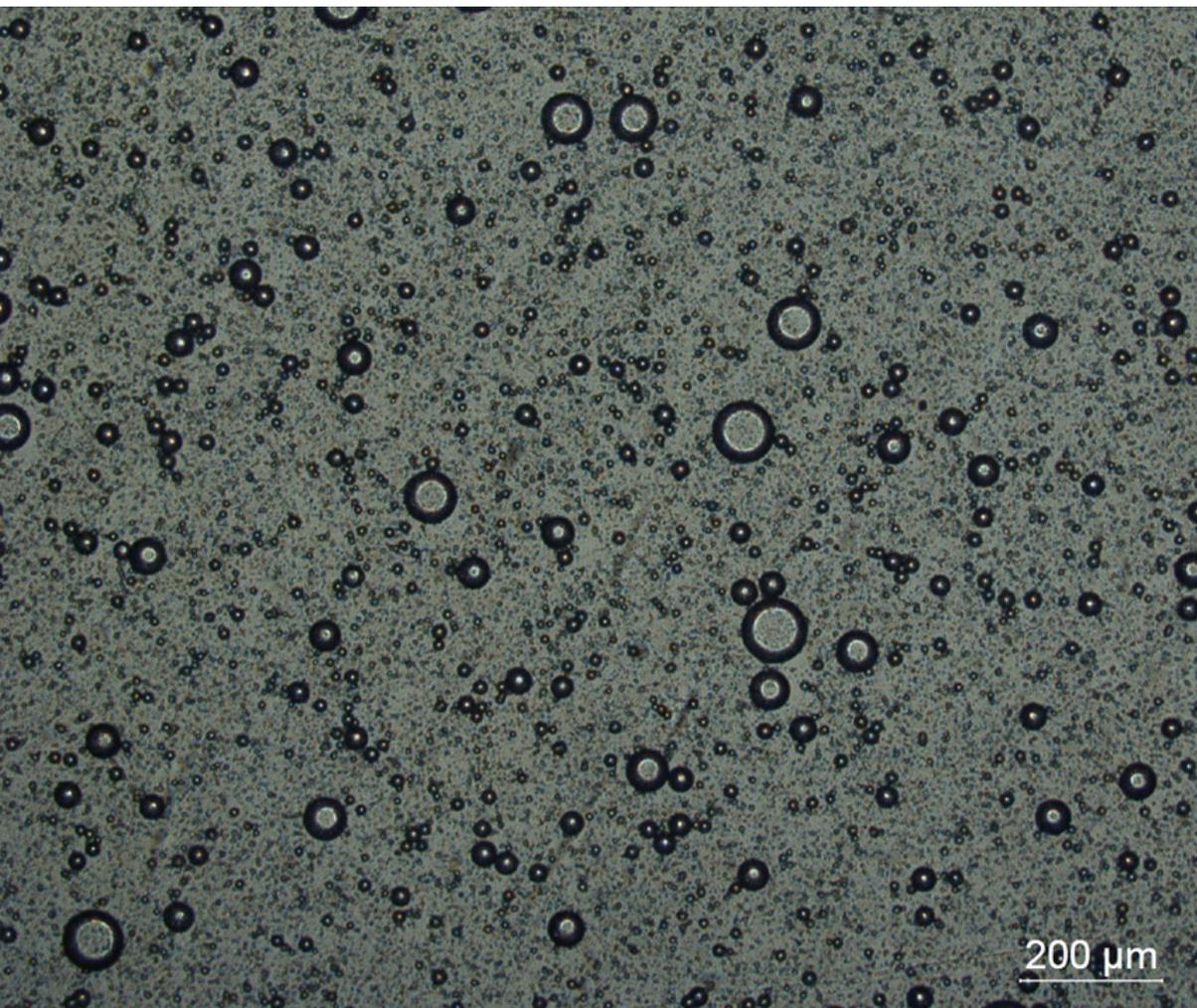




## Emulsões Estabilizadas por Celulose Bacteriana Nanofibrilada: Efeito do Grau de Oxidação



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
210**

**Emulsões Estabilizadas por  
Celulose Bacteriana Nanofibrilada:  
Efeito do Grau de Oxidação**

Morsyleide de Freitas Rosa  
Mayara Lima Goiana  
André Luís Sousa Pereira  
João Paulo Saraiva Morais

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
www.embrapa.br/agroindustria-tropical  
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente  
*Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva  
*Celli Rodrigues Muniz*

Secretária-administrativa  
*Eveline de Castro Menezes*

Membros  
*Marlos Alves Bezerra, Ana Cristina Portugal  
Pinto de Carvalho, Deborah dos Santos Garruti,  
Dheyne Silva Melo, Ana Iraidy Santa Brigida,  
Eliana Sousa Ximendes, Nívia da Silva Dias*

Revisão de texto  
*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica  
*Rita de Cassia Costa Cid*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Foto da capa  
*Micrografia de André Luís Sousa Pereira*

**1ª edição**  
On-line (2020)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Emulsões estabilizadas por celulose bacteriana nanofibrilada: efeito do grau de oxidação / Morsyleide de Freitas Rosa... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2020.

21 p. : il. ; 16 cm x 22 cm – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 210).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Emulsões *Pickering*. 2. Surfactantes. 3. Oxidação TEMPO. 4. Nanotecnologia I. Rosa, Morsyleide de Freitas. II. Goiana, Mayara Lima. III. Pereira, André Luís Sousa. IV. Morais, João Paulo Saraiva. V. Série.

CDD 620.5

## Sumário

---

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| Resumo.....                 | 4  |
| Abstract.....               | 6  |
| Introdução.....             | 7  |
| Material e Métodos.....     | 9  |
| Resultados e Discussão..... | 12 |
| Conclusões.....             | 18 |
| Agradecimentos.....         | 18 |
| Referências.....            | 18 |

# Emulsões Estabilizadas por Celulose Bacteriana Nanofibrilada: Efeito do Grau de Oxidação<sup>1</sup>

Morsyleide de Freitas Rosa<sup>1</sup>

Mayara Lima Goiana<sup>2</sup>

André Luís Sousa Pereira<sup>3</sup>

João Paulo Saraiva Morais<sup>4</sup>

**Resumo** - Emulsões *Pickering* são sistemas formados pela homogeneização de dois líquidos imiscíveis entre si, estabilizados por partículas sólidas coloidais. Partículas naturais estão sendo amplamente estudadas para redução ou substituição de surfactantes sintéticos, empregados como estabilizantes, devido aos seus efeitos adversos, incluindo toxicidade. Uma das fontes naturais promissoras é a celulose bacteriana, que, quando utilizada na forma de nanofibrilas, permite modificações nas propriedades de superfície e tamanho das micelas da emulsão por mecanismos físicos e químicos. No presente trabalho, celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF), obtida por combinação de oxidação mediada por 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) e fibrilação em moinho coloidal, foi utilizada para estudo preliminar da influência do grau de oxidação nas propriedades e estabilidade de emulsões *Pickering* de óleo de girassol em água. Seis formulações, com dois diferentes graus de oxidação (G.O.) (CBNF1, G.O. 9,27; e CBNF2, G.O. 18,56) e três diferentes concentrações de nanocelulose (0,5; 0,75 e 1,0% m/m), foram avaliadas. A concentração da nanocelulose apresentou

---

<sup>1</sup> Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

<sup>2</sup> Engenheira de Alimentos, bolsista da FUNCAP, mestranda em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

<sup>3</sup> Engenheiro Químico, bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial, doutor em Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

<sup>4</sup> Farmacêutico, mestre em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB

um efeito dependente do seu grau de oxidação: emulsões formuladas com nanocelulose menos oxidada (CBNF1) apresentaram gotas menores com o aumento da sua concentração, e emulsões formuladas com nanocelulose mais oxidada (CBNF2) apresentaram gotas maiores com o aumento da sua concentração. Para um mesmo grau de oxidação, emulsões mais estáveis foram obtidas em concentrações mais baixas de nanocelulose. Conclui-se, portanto, que a estabilidade das emulsões depende da combinação do grau de oxidação e da concentração de nanofibrilas. A formulação contendo CBNF2 a 0,5% m/m foi a mais promissora em termos de estabilidade e processamento.

**Termos para indexação:** emulsões *Pickering*, surfactantes, oxidação TEMPO.

## Emulsions Stabilized by Nanofibrillated Bacterial Cellulose: Effect of Oxidation Degree

**Abstract** - Pickering emulsions are systems formed by the homogenization of two immiscible liquids, stabilized by solid colloidal particles. Bio-based particles have been extensively studied to reduce or replace synthetic surfactants, used as stabilizers, due to their adverse effects, including toxicity. One of the promising natural sources is nanofibrillated bacterial cellulose, which can modify the surface properties and the micellar size due to physical and chemical mechanisms. In the present work, nanofibrillated bacterial cellulose (NFBC), obtained by combining oxidation mediated by 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) and fibrillation in a colloid mill, was used to preliminary study the influence of the degree of oxidation on the properties and stability of sunflower oil in water (O / W) Pickering emulsions. Six formulations, with two different degrees of oxidation (D.O.) (NFBC1, D.O. 9.27; and NFBC2, D.O. 18.56) and three different concentrations of nanocellulose (0.5, 0.75 and 1.0% w / w), were evaluated. It was observed that the higher the degree of oxidation, the smaller the average diameter of the droplets. The concentration of the nanocellulose showed an effect dependent on its degree of oxidation: emulsions formulated with less oxidized nanocellulose (NFBC1) presented smaller droplets with the increase of its concentration, and emulsions formulated with more oxidized nanocellulose (NFBC2) showed larger droplets with the increase of its concentration. For the same degree of oxidation, more stable emulsions were obtained at lower concentrations of nanocellulose. It is concluded, therefore, that the stability of the emulsions depends on the combination of both effects. The formulation containing 0.5% w / w NFBC2 was the most promising in terms of stability and processing.

**Index terms:** Pickering emulsions, surfactants, TEMPO oxidation.

## Introdução

---

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis que consistem em dois líquidos imiscíveis (geralmente óleo e água), com um dos líquidos disperso como pequenas gotas esféricas no outro. Essa mistura só é possível graças a um agente estabilizante, em geral surfactantes, que são substâncias com afinidade pelas duas fases (uma molécula com cadeia carbônica hidrofóbica e com grupo funcional hidrofílico na extremidade, por exemplo) e que envolvem as gotas (em sistemas O/A, o lado hidrofóbico interage com o óleo e o lado hidrofílico com a água, e a superfície causa repulsão entre as gotas, que possuem a mesma carga eletrostática), impedindo que se juntem ou coalesçam, evoluindo para uma separação de fases (McClements, 2005). Sistemas emulsionados estão presentes em diversos tipos de produtos, tais como leite, cremes, bebidas, sopas, molhos para saladas, maionese, sorvetes, manteiga e margarina.

No início do século 20, pesquisas confirmaram que partículas coloidais sólidas poderiam ser fortemente adsorvidas nas interfaces óleo/água, formando sistemas eficientes para estabilizar emulsões, dando origem às emulsões *Pickering* (Ramsden, 1904; Pickering, 1907; Linke; Drusch, 2018). Essa abordagem ganhou destaque nos últimos 20 anos devido à necessidade de redução ou substituição dos surfactantes sintéticos nas emulsões, especialmente em razão de seu emprego ter sido associado a efeitos adversos em alimentos, tais como, irritabilidade devido à solubilização lipídica da membrana plasmática, e mau funcionamento de proteínas, de peptídeos e do DNA (Jia et al., 2016).

Nesse contexto, materiais provenientes da biomassa, como fosfolipídeos (lecitina), biosurfactantes/bioemulsificantes (saponinas, ramnolipídeos), proteínas (caseinatos, proteína do ovo, gelatina) e polissacarídeos (goma arábica, pectina, amido) (McClements et al., 2017), em especial a celulose, que é anfifílica e de fácil modificação de superfície (Jia et al., 2016; Jiménez Saelices; Capron, 2018), estão sendo pesquisados e/ou aplicados como possíveis agentes interfaciais em substituição aos surfactantes sintéticos.

Dentre as principais fontes de celulose, a celulose bacteriana (CB) tem atraído muita atenção devido à pureza (livre de resíduos lignocelulósicos) e ao fato de ser reconhecida como segura (em inglês GRAS, designação da *Food*

*and Drug Administration*) (Zhai et al., 2018). A celulose bacteriana utilizada em emulsões *Pickering* deve apresentar pelo menos uma de suas dimensões reduzida à escala nanométrica (< 100 nm) por processos químicos (ex.: hidrólise ácida, hidrólise enzimática), gerando nanocristais (nanopartículas majoritariamente compostas por celulose cristalina) ou por processos físicos (ex.: microfluidização, moinho coloidal), que gera nanofibrilas (nanopartículas de celulose cristalina e amorfa interligadas alternadamente, de comprimento mais alongado do que os nanocristais) (Salas et al., 2014).

Dentre os diferentes processos de obtenção de nanocelulose, a combinação de oxidação mediada por 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) e nanofibrilação vem sendo amplamente estudada (Fukuzumi et al., 2014; Isogai et al., 2011; Nemoto et al., 2015; Saito et al., 2007) devido à possibilidade de modificação de tamanho de cadeia e da quantidade de carga superficial. A reação é seletiva para o carbono C6, modificando a hidroxila (-OH) para carboxilato (-COO<sup>-</sup>), aumentando a hidrofilicidade e a carga superficial (Saito; Isogai, 2004). O processo oxidativo é bastante severo para a região amorfa, fragilizando a fibrila e facilitando o processo de obtenção de nanocelulose. Diferente de uma oxidação comum com hipoclorito, que leva no mínimo 4 horas, é utilizado o catalisador TEMPO, um radical nitroxil estável negativo para o teste de Ames (substância não carcinogênica), que reduz o tempo de reação para 1 hora e 30 minutos. Estudos apontam que nanofibrilas de celulose oxidada TEMPO apresentam baixíssima toxicidade se comparada a outros tipos de nanomateriais (nanocristais e nanotubos de carbono), o que as torna candidatas a aplicação em biomedicina (Ventura et al., 2020) e como substituintes de gordura em formulações alimentícias de baixo teor calórico (Aaen et al., 2019).

No estudo de emulsões *Pickering*, as propriedades de superfície das nanoceluloses, tais como o caráter hidrofílico, a quantidade de carga, o tipo de grupo funcional e o tamanho de cadeia, são amplamente avaliadas e relacionadas à estabilidade das emulsões (Jia et al., 2016; Jiménez Saelices; Capron, 2018; Linke; Drusch, 2018; Zhai et al., 2018; Low et al., 2020). No presente trabalho, celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF), com dois graus de oxidação e três concentrações, foi proposta como agente interfacial para estabilizar emulsões óleo em água (O/A). O objetivo deste estudo preliminar foi determinar a influência do grau de oxidação da CBNF nas propriedades e estabilidade das emulsões *Pickering* obtidas.

## Material e Métodos

---

### Material e reagentes

Películas de celulose bacteriana (CB) foram cedidas pelo Grupo Empresarial SEVEN (Londrina, Brasil). Óleo de girassol (Liza/Cargill, São Paulo, Brasil) foi adquirido em estabelecimento comercial. Catalisador radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) foi obtido da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Hidróxido de sódio (NaOH) P.A., brometo de sódio (NaBr) P.A., e hipoclorito de sódio 12-13% v/v (NaClO) foram obtidos da Dinâmica (Caxias do Sul, Brasil). Os reagentes foram utilizados sem purificação adicional.

### Obtenção da celulose bacteriana nanofibrilada

Inicialmente, as películas de CB foram desconstruídas em processador semi-industrial (Robot-Coupe), secas em estufa (50 °C, 48 h) e processadas em misturador de alta rotação (1 min, 4800 rpm, VITAMIX VITA Prep) para obtenção de um pó. A oxidação seguiu a metodologia adotada por Saito et al. (2007). Para 1 g de CB seca, foram adicionados 100 mL de água destilada, 0,1 g de NaBr e 0,016 g de TEMPO. Após a dissolução dos reagentes, 3,725 mL de NaClO foram adicionados e a reação iniciada e mantida sob agitação magnética à temperatura de  $25 \pm 1$  °C. O pH foi medido continuamente ao longo da reação por pHmetro e ajustado para 10,0-10,5 com soluções de NaOH 1 mol/L e HCl 1 mol/L. Duas diferentes concentrações de NaClO (5 e 30 mmol/g celulose) foram utilizadas para se obter dois diferentes graus de oxidação. Ao término da reação, o material foi centrifugado (24.456x g, 4 °C, 15 min) e lavado com água destilada (200 mL) para remoção de reagentes. Foi realizada a determinação do teor mássico e considerado, para cálculos, como a massa seca.

Cada material oxidado foi disperso em 1 L de água destilada para uma concentração final de 1% m/m. Para a nanofibrilação, utilizou-se um moinho coloidal (NOVA METEOR), regime contínuo/sob circulação, por 10 min, com distância entre dentes de  $\frac{1}{4}$  de volta. As nanoceluloses obtidas foram nomeadas de acordo com a quantidade de NaClO (5 mmol/g celulose,

CBNF1; e 30 mmol/g celulose, CBNF2) e acondicionadas em frascos Schott sob refrigeração (4 °C).

## Obtenção das emulsões *Pickering*

Seis emulsões foram formuladas pela adição de óleo de girassol em água na proporção óleo/água (O/A) de 10/90 v/v (Bai et al., 2019; Winuprasith et al., 2018), utilizando-se suspensões de nanocelulose oxidadas (CBNF1 e CBNF2) e três concentrações de CBNF na fase aquosa (0,5; 0,75; 1,0% m/m), conforme detalhado na Tabela 1. Cada formulação foi homogeneizada em dispersador (10.000 rpm, 10 min; ULTRA-TURRAX® IKA T25 digital). Após a homogeneização, um volume de 50 mL das amostras foi transferido para tubos de ensaio cilíndricos rosqueados (20 mm x 150 mm, Vidrolabor) e dispostas verticalmente em temperatura de 20 °C para estudo da estabilidade.

**Tabela 1.** Descrição das formulações testadas para obtenção de emulsões *Pickering* de óleo de girassol e água.

| Nanocelulose oxidada | Concentração de nanocelulose (% m/m) |            |           |
|----------------------|--------------------------------------|------------|-----------|
|                      | 0,5                                  | 0,75       | 1,0       |
| CBNF1 <sup>1</sup>   | CBNF1 0,5                            | CBNF1 0,75 | CBNF1 1,0 |
| CBNF2 <sup>2</sup>   | CBNF2 0,5                            | CBNF2 0,75 | CBNF2 1,0 |

<sup>1</sup> CBNF1: Celulose bacteriana nanofibrilada preparada a partir de 5 mmol de NaClO/g celulose; <sup>2</sup> CBNF2: Celulose bacteriana nanofibrilada preparada a partir de 30 mmol de NaClO/g celulose.

## Caracterizações

### Titulação condutimétrica da CB oxidada

A determinação do teor de grupos carboxilato (-COO<sup>-</sup>) na cadeia celulósica foi realizada por titulação condutimétrica (Besbes et al., 2011; Saito; Isogai, 2004). Para 1 g de material seco, foram adicionados 183,3 mL de H<sub>2</sub>O e 16,67 mL de NaCl 0,01 mol/L. O pH foi ajustado entre 2,5 - 3,0, adicionando-se HCl 0,1 mol/L. Após a homogeneização, o teor de grupos carboxilato foi obtido por titulação, de acordo com equação 1:

$$C = [(V_1 - V_0) \times C_{NaOH}] / m \quad (1)$$

onde  $C$  é o teor de grupos carboxilato,  $V_0$  é o volume de NaOH (L) necessário para neutralizar o HCl,  $V_1$  é o volume (L) necessário para neutralizar o grupo carboxila (carboxilato protonado pelo HCl),  $C_{\text{NaOH}}$  é a concentração de NaOH (mol/L) e  $m$  é a massa (g) do material.

## **Espectroscopia de absorção de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Para confirmar a presença do grupo carboxilato, procedeu-se à caracterização por FTIR. Para tal, uma amostra de CBNF foi seca em estufa a 50 °C por 24 h, misturada com KBr na concentração de 3% (m/m) e pressionada até formação de pastilha com KBr translúcido. O espectro do FTIR foi obtido em um Shimadzu FTIR-8300 na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

## **Ângulo de contato**

Os ângulos de contato foram medidos em triplicata, de acordo com a norma ASTM D-5725-99 (ASTM, 2003) a  $25 \pm 1$  °C. Suspensões de nanocelulose foram espalhadas em lâminas de vidro e secas em estufa a 50 °C por 24 h. Para cada leitura, uma gota de água deionizada foi depositada na superfície do filme formado. As imagens foram capturadas em câmera Nikon logo após a formação da gota. O ângulo foi obtido pelo programa *Angle Calculator* (G B X Visiodrop, versão 13.05.2.10 GB), o software que acompanha o equipamento de ângulo de contato (Digidrop, G B X, França).

## **Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

A microscopia foi realizada na Embrapa Agroindústria Tropical. Amostras da suspensão de CBNF foram diluídas em água Mili-Q (1 g/L) e montadas em *grids* de 300 *mesh*, com adição de uma gota de solução de ácido fosfotúngstico (0,1% m/v). Os *grids* foram visualizados em um Tescan Veja 3 (Tescan, República Tcheca), com detector de STEM sob voltagem de 30 kV. Os diâmetros médios de 100 partículas de nanoceluloses foram determinados utilizando-se o freeware Gimp 2.6 (versão 2.10.14, <https://www.gimp.org/>).

## Diâmetro médio das gotas de óleo nas emulsões

As emulsões foram visualizadas em microscópio óptico (ZEISS AXIO Imager A2) com câmera acoplada (ZEISS AxioCam ICc 5), logo após a formulação (dia 0) e após 15 dias. Uma gota da amostra foi cuidadosamente removida da parte mais central do tubo, em termos de altura, colocada sobre uma lâmina e cuidadosamente espalhada por lamínula. A área de cada gota foi determinada pelo freeware ImageJ (versão 1.52a, Wayne Hasband, *National Institutes of Health*, USA) e o diâmetro médio das gotas de óleo, ponderado pela área ( $D_{32}$ ), foi determinado pela equação 2:

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (2)$$

onde n é o número de gotas detectadas com diâmetro d.

## Resultados e Discussão

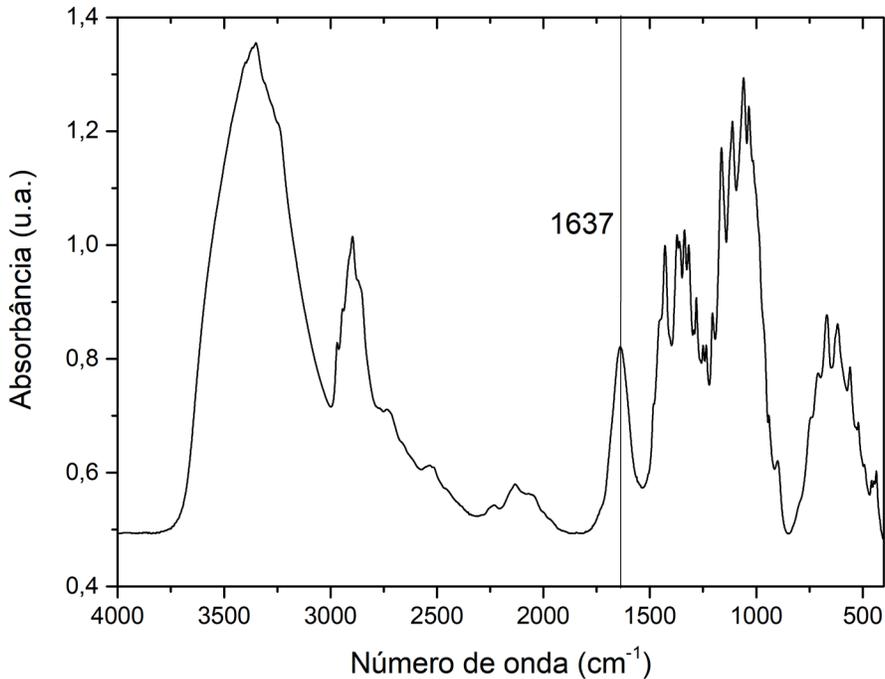
---

### Celulose bacteriana nanofibrilada

As duas nanoceluloses apresentaram conteúdos de grupos carboxilato equivalentes à severidade da oxidação aplicada por meio da titulação: CBNF1: 0,5678 mmol de grupos COO<sup>-</sup>/g celulose (Grau de oxidação, G.O. = 9,27%) e CBNF2: 1,13 mmol de grupos COO<sup>-</sup>/g celulose (G.O. = 18,56%), confirmando a relação direta com a quantidade de NaClO empregada. Quanto maior a quantidade de grupos carboxilato, maior a carga por partícula de nanocelulose, ou seja, maior a repulsão eletrostática (Jia et al., 2016). Outro efeito observado para a oxidação mediada por TEMPO é que, embora seletiva para o carbono C6, é agressiva para a região amorfa, ocasionando fragilidade às fibras e, conseqüentemente, facilitando o processo de fibrilação (Isogai et al., 2011). É esperado, portanto, que quanto maior a oxidação, menor a dimensão da fibra.

De forma a exemplificar a presença do grupamento na celulose bacteriana nanofibrilada, a Figura 1 e a Tabela 2 apresentam, respectivamente, um espectro de FTIR típico e atribuições dos números de onda para uma amostra de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF1). Além das atribuições

típicas de celulose, o número de onda de  $1637\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao grupo carboxilato (Jiang; Hsieh, 2016; Xiao et al., 2015), evidencia a oxidação do material.



**Figura 1.** FTIR de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF1) obtida por processo de oxidação TEMPO seguida de nanofibrilação em moinho coloidal.

O grupo carboxilato também pode interferir no comportamento de superfícies, modificando o caráter hidrofílico. A celulose é naturalmente anfifílica (Jiang; Hsieh, 2014), apresentando ângulo de contato na faixa de  $50^\circ$  a  $65^\circ$  (Jia et al., 2016; Zhai et al., 2018). De acordo com os resultados de ângulo de contato apresentados na Tabela 3, observa-se que a oxidação aumentou a hidroflicidade das nanoceluloses, diminuindo o valor do ângulo de contato da faixa de  $50^\circ$  a  $65^\circ$  para a faixa entre  $23^\circ$  e  $27^\circ$ . Considerando-se o erro experimental, não foi observada diferença entre os valores obtidos para as amostras.

**Tabela 2.** Atribuições dos números de onda observados no FTIR.

| Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) | Atribuições  |
|------------------------------------|--|
| 3352                               | ν O-H  |
| 2895                               | ν C-H  |
| 1637                               | ν <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>                                   |
| 1425                               | δ CH <sub>2</sub> , O—C—H, O—CH <sub>3</sub> , deformação em plano |
| 1367                               | δ CH <sub>3</sub>  |
| 1316                               | H—C—H, CH <sub>2</sub> , vibração imobilizada                      |
| 1277                               | ν C-O  |
| 1199                               | C-O-H, deformação em plano   |
| 1160                               | ν <sub>as</sub> C-O-C da ligação β-glicosídica bond                |
| 1115                               | ν C-O da celulose cristalina e anel de glicose                     |
| 1057                               | ν C-O-C do esqueleto do anel de piranose                           |
| 1031                               | ν C-O da celulose  |
| 903                                | Vibração de celulose amorfa, estiramento do anel de glicose        |

Fonte: Sócrates, 2004.

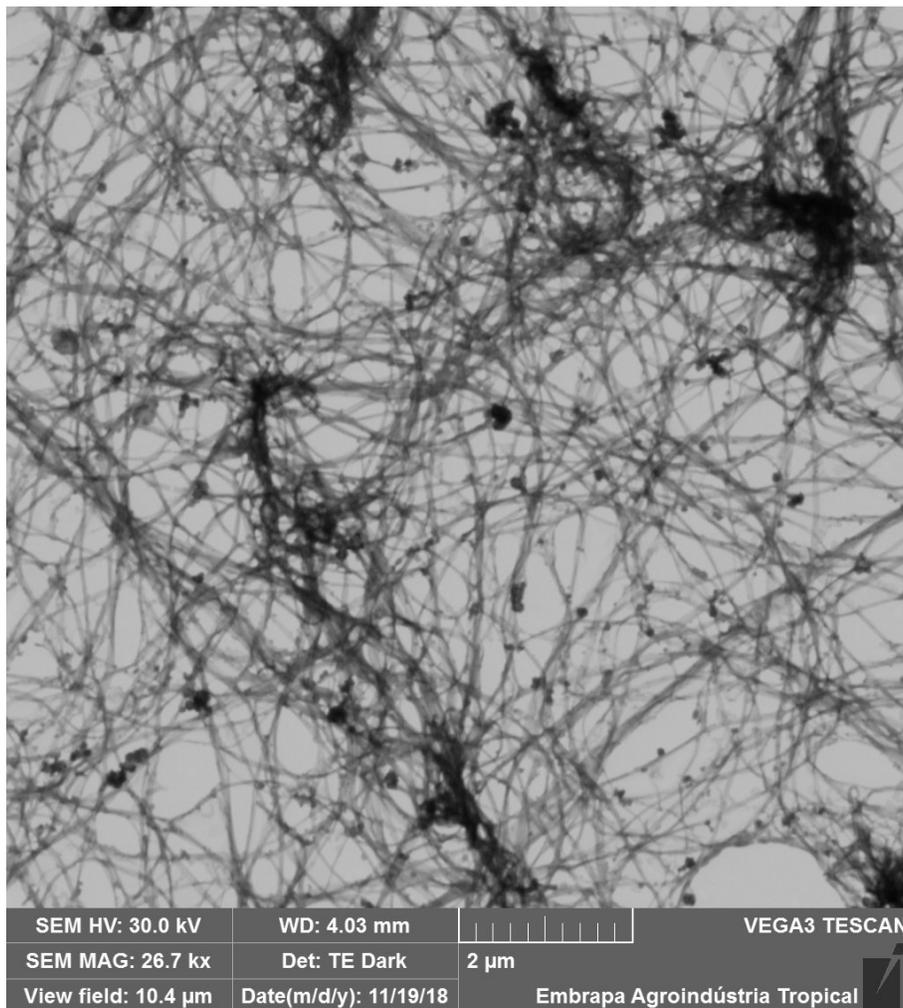
**Tabela 3.** Ângulo de contato das nanoceluloses e diâmetro médio ponderado das gotas de óleo (D<sub>32</sub>) das emulsões O/A formuladas em três concentrações de nanocelulose (0,5%; 0,75; 1% m/m) e dois graus de oxidação (CBNF1 e CBNF2) nos 0 e 15 dias de estocagem à 20 °C.

| Amostra            | Ângulo de contato (°) | Concentração de nanocelulose (% m/m) | D <sub>32</sub> (µm) |      |
|--------------------|-----------------------|--------------------------------------|----------------------|------|
|                    |                       |                                      | 0 d                  | 15 d |
| CBNF1 <sup>1</sup> | 24,6 ± 0,6            | 0,5                                  | 14,1                 | 16,4 |
|                    |                       | 0,75                                 | 9,4                  | 19,3 |
|                    |                       | 1,0                                  | 11,5                 | 16,1 |
| CBNF2 <sup>2</sup> | 26,5 ± 3,8            | 0,5                                  | 8,0                  | 8,0  |
|                    |                       | 0,75                                 | 9,8                  | 6,4  |
|                    |                       | 1,0                                  | 9,0                  | 15,3 |

<sup>1</sup> CBNF1: Celulose bacteriana nanofibrilada preparada a partir de 5 mmol de NaClO/g celulose; <sup>2</sup> CBNF2: Celulose bacteriana nanofibrilada preparada a partir de 30 mmol de NaClO/g celulose.

A Figura 2 exemplifica uma micrografia típica de uma amostra de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF1). As fibras dispersas evidenciam a eficácia do processo de nanofibrilação, produzindo nanopartículas com diâmetro médio de 43,0 nm, como foi relatado em resultados anteriores (Pereira et al., 2020).

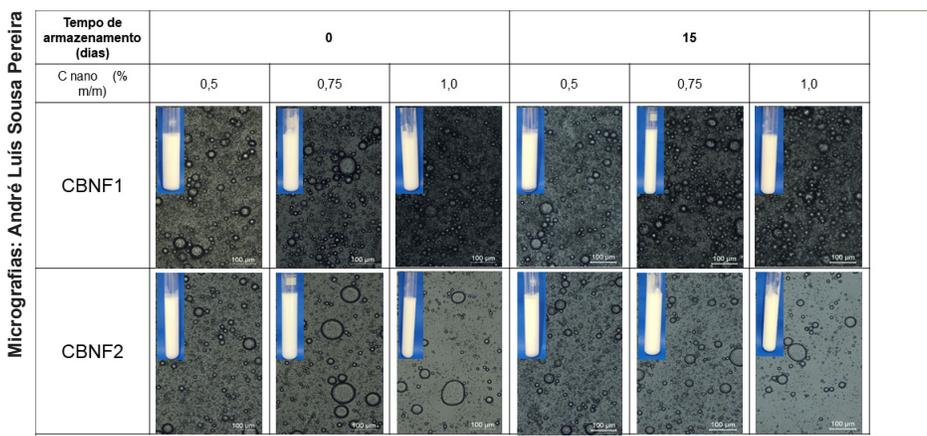
Micrografia: Celli Rodrigues Muniz



**Figura 2.** Micrografia típica de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF1) obtida por microscopia eletrônica.

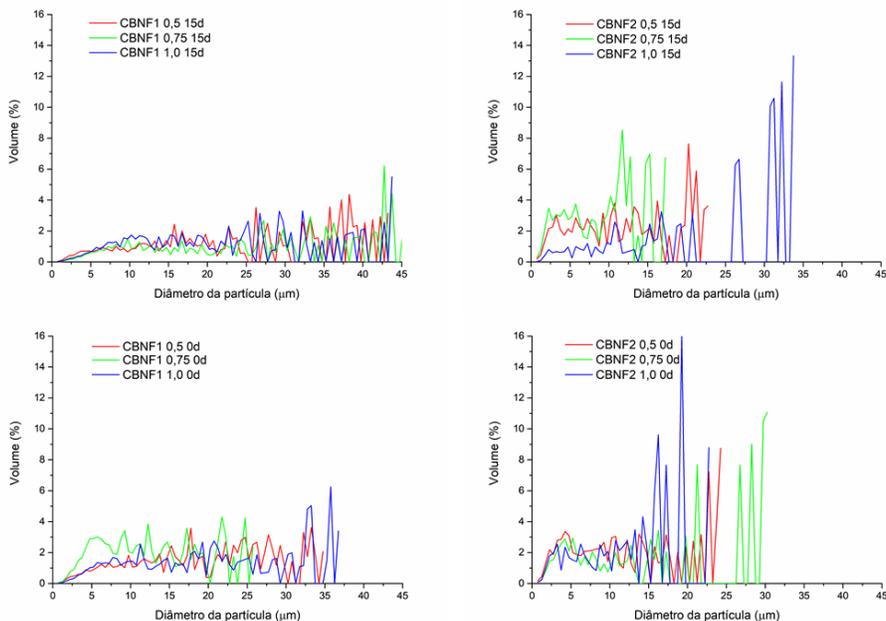
## Emulsões *Pickering*

Foram obtidas emulsões macroscopicamente estáveis (Figura 3) para todas as formulações, não sendo observado nenhum fenômeno de desestabilização (ex.: óleo na superfície, clareamento na base, formação de gotas de óleo visíveis, separação de fases) mesmo após 15 dias. Contudo, pelas micrografias e pelo gráfico de volume (Figura 4), é possível observar variações nos diâmetros das gotas de óleo, em função da concentração de nanocelulose, do grau de oxidação e do tempo de armazenamento. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.



**Figura 3.** Micrografias de emulsões *Pickering* O/A com 0 e 15 dias de estocagem à 20 °C, para diferentes concentrações (0,5% m/m, 0,75% m/m, 1% m/m) e graus de oxidação de celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF1, CBNF2) (ampliação de 10x e escala de 100 µm).

Sabe-se que o grau de oxidação das nanoceluloses apresenta efeitos antagônicos no que diz respeito ao equilíbrio das emulsões. Por um lado, o aumento da oxidação resulta em nanoceluloses menores, favorecendo a dispersão das gotículas de óleo e um menor tamanho de gotas, o que pode contribuir para retardar fenômenos de desestabilização. Por outro lado, uma maior concentração de cargas na superfície das nanoceluloses, em razão do maior conteúdo de grupos carboxilato, pode levar a um aumento na repulsão eletrostática entre as cadeias de nanocelulose envolvendo a gota de óleo, causando instabilidade e formando gotas de maior diâmetro.



**Figura 4.** Gráficos de volume das emulsões *Pickering* O/A com 0 e 15 dias para diferentes concentrações (0,5% m/m, 0,75% m/m, 1% m/m) e graus de oxidação de CBNF (CBNF1, CBNF2) (Volume (%) vs. Diâmetro de partícula (µm)).

No que diz respeito ao efeito da concentração de nanocelulose, observou-se que os diâmetros médios das gotas de óleo são afetados pela concentração de nanocelulose. Isso pode estar diretamente ligado às propriedades da superfície da nanocelulose (Jiménez Saelices; Capron, 2018), ou seja, à quantidade de grupos carboxilato. Quanto maior a quantidade de grupos carboxilato, maior a interação com água e menor a interação com o óleo. Desse modo, a nanocelulose estará em maior contato com a fase aquosa do que imersa na fase oleosa na superfície da gota da emulsão, levando a uma maior quantidade de partículas para envolver e estabilizar a gota. Contudo, como já mencionado, a quantidade de grupos carboxilato impacta na carga superficial da nanocelulose, afetando também o equilíbrio do sistema.

Do ponto de vista da estabilidade das emulsões, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, após 15 dias, ocorreram alterações nos valores dos diâmetros médios na maioria das formulações. Para ambos

tratamentos, CBNF1 e CBNF2, a amostra com menor alteração foi a de concentração 0,5% m/m. É interessante notar que as gotas nos tratamentos CBNF1 apresentaram menor alteração e menor diâmetro. Isso pode ser um indicativo de que um excesso de carboxilatos pode gerar instabilidade no sistema. A redução do diâmetro médio para o tratamento CBNF2-0,75% m/m está relacionada ao fato de que gotas de diâmetros muito maiores não alteram estatisticamente o valor final devido à baixa frequência de formação (Badolato et al., 2007; Jia et al., 2016).

## Conclusões

---

É possível obter uma emulsão estável entre óleo de girassol e água utilizando-se celulose bacteriana nanofibrilada oxidada. E alterações na carga superficial das nanoceluloses, promovida pela oxidação mediada por TEMPO, influenciam o tamanho das gotas de óleo no sistema de emulsão *Pickering*.

## Agradecimentos

---

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo apoio financeiro ao projeto; ao Grupo SEVEN pelo fornecimento de películas de celulose bacteriana e autorização para realização desta pesquisa; à Dra. Celli Rodrigues Muniz pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

## Referências

---

AAEN, R.; SIMON, S.; BRODIN, F. W.; SYVERUD, K. The potential of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils as rheology modifiers in food systems. **Cellulose**, v. 26, p. 5483-5496, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-019-02448-3>>.

BADOLATO, G. G.; AGUILAR, F.; SCHUCHMANN, H. P.; SOBISCH, T.; LERCHE, D. Evaluation of long term stability of model emulsions by multisample analytical centrifugation. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 134, maio, p. 66-73, 2007. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/2882\\_2008\\_076](https://doi.org/10.1007/2882_2008_076)>.

- BAI, L.; LV, S.; XIANG, W.; HUAN, S.; McCLEMENTS, D. J.; ROJAS, O. J. Oil-in-water Pickering emulsions via microfluidization with cellulose nanocrystals: 1. Formation and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 96, jan. p. 699-708, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.038>>.
- BESBES, I.; ALILA, S.; BOUFI, S. Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 975-983, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.052>>.
- FUKUZUMI, H.; TANAKA, R.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Dispersion stability and aggregation behavior of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils in water as a function of salt addition. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1553-1559, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-014-0180-z>>.
- ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 71-85, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c0nr00583e>>.
- JIA, Y.; ZHAI, X.; FU, W.; LIU, Y.; LI, F.; ZHONG, C. Surfactant-free emulsions stabilized by tempo-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 907-915, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.099>>.
- JIANG, F.; HSIEH, Y.-L. Self-assembling of TEMPO oxidized cellulose nanofibrils as affected by protonation of surface carboxyls and drying methods. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 3, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01123>>.
- JIANG, F.; HSIEH, Y.-L. Amphiphilic superabsorbent cellulose nanofibril aerogels. **Journal of Materials Chemistry**, v. 2, n. 18, p. 6337-6342, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C4TA00743C>>.
- JIMÉNEZ SAELICES, C.; CAPRON, I. Design of Pickering Micro- and Nanoemulsions based on the structural characteristics of nanocelluloses. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 2, p. 460-469, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01564>>.
- LINKE, C.; DRUSCH, S. Pickering emulsions in foods - opportunities and limitations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 12, p. 1971-1985, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1290578>>.
- LOW, L. E.; SIVA, S. P.; HO, Y. K.; CHAN, E. S.; TEY, B. T. Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties and stability of Pickering emulsion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 277, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102117>>.
- McCLEMENTS, D. J. Principles, practices, and techniques. **Food Emulsions**, v. 2, 2005.

McCLEMENTS, D. J.; BAI, L.; CHUNG, C. Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 205-236, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-030154>>.

NEMOTO, J.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Simple Freeze-Drying Procedure for Producing Nanocellulose Aerogel-Containing, High-Performance Air Filters. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 35, p. 19809-19815, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsami.5b05841>>.

PEREIRA, A. L. S.; FEITOSA, J. P. A.; MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F. Bacterial cellulose aerogels: Influence of oxidation and silanization on mechanical and absorption properties. **Carbohydrate Polymers**, 250, art n. 116927, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116927>>.

PICKERING, S. U., M. A., F. R. S. CXCVI. — Emulsions. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 91, p. 2001-2021, 1907. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/CT9079102001>>.

RAMSDEN, W. Separation of solids in the surface-layers of solutions and 'suspensions' (observations on surface-membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation). **Royal Society**, v. 72, p. 477-486, 1904. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspl.1903.0034>>.

SAITO, T.; ISOGAI, A. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose: the effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1983-1989, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bm0497769>>.

SAITO, T.; KIMURA, S.; NISHIYAMA, Y.; ISOGAI, A. Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. **Biomacromolecules**, v.8, n. 8, p. 2485-2491, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bm0703970>>.

SALAS, C.; NYPELÖ, T.; RODRIGUEZ-ABREU, C.; CARRILLO, C.; ROJAS, O. J. Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 383-396, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.10.003>>.

VENTURA, C.; PINTO, F.; LOURENÇO, A. F.; FERREIRA, P. J. T.; LOURO, H.; SILVA, M. J. On the toxicity of cellulose nanocrystals and nanofibrils in animal and cellular models. **Cellulose**, v. 27, p. 5509-5544, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-020-03176-9>>.

WINUPRASITH, T.; KHOMEIN, P.; MITBUMRUNG, W.; SUPHANTHARIKA, M.; NITITHAMYONG, A.; McCLEMENTS, D. J. Encapsulation of vitamin D3 in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: Impact on in vitro digestion and

bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 153-164, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.047>>.

XIAO, S.; GAO, R.; LU, Y.; LI, J.; SUN, Q. Fabrication and characterization of nanofibrillated cellulose and its aerogels from natural pine needles. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 202<sup>a</sup> - 209, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.041>>.

ZHAI, X.; LIN, D.; LIU, D.; YANG, X. Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. **Food Research International**, v. 103, p. 12-20, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.030>>.

**Embrapa**

---

*Agroindústria Tropical*



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

