



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**HENRIQUE TREVISAN**

**EXTRAÇÃO DE LIGNINA DO CAPIM ELEFANTE PARA PRODUÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA**

**CAMPINAS  
2019**

**HENRIQUE TREVISAN**

**EXTRAÇÃO DE LIGNINA DO CAPIM ELEFANTE PARA PRODUÇÃO DE  
NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título  
de Mestre em Química na área de Físico-Química.**

**Orientadora: Profa. Dra. Camila Alves de Rezende**

**O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo  
aluno Henrique Trevisan e orientada pela Profa. Dra. Camila Alves de Rezende**

**CAMPINAS  
2019**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

T729e Trevisan, Henrique, 1993-  
Extração de lignina do capim elefante para produção de nanopartículas de lignina / Henrique Trevisan. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Camila Alves de Rezende.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanopartículas de lignina. 2. Lignina - Extração. 3. Capim-elefante. 4. Atividade antioxidante. 5. Fotoproteção. I. Rezende, Camila Alves de, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Lignin extraction from elephant grass and its use for lignin nanoparticle production

**Palavras-chave em inglês:**

Lignin nanoparticles

Lignin extraction

Elephant grass

Antioxidant activity

Photoprotection

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Mestre em Química na área de Físico-Química

**Banca examinadora:**

Camila Alves de Rezende [Orientador]

Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Rubia Figueredo Gouveia

**Data de defesa:** 26-06-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: 0000-0003-2260-5038

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9833607256062771>

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Camila Alves de Rezende (Orientadora)

Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira (IQ / UNICAMP)

Dra. Rubia Figueredo Gouveia (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **Henrique Trevisan**, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de junho de 2019.

Walking, I am listening to a deeper way. Suddenly, all my ancestors are behind me. Be still – they say. Watch and listen. You are the result of the love of thousands.

Linda Hogan

Her er ditt vern mot vold,  
her er ditt sverd:  
troen på livet vårt,  
menneskets verd.

Johan Nordahl Brun Grieg – 1936

Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté.  
Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

Marie Skłodowska Curie – 1938.

*Aos meus pais e à minha irmã.  
Aos meus amigos e às minhas amigas.  
A você, caro(a) leitor(a), espero que encontre algo de proveitoso neste texto.*

## AGRADECIMENTOS

A cooperação é o ato mais nobre do ser humano. Assim, agradeço a todos que colaboraram para a gênese dessa dissertação de mestrado. Ela não existiria sem vocês.

Em especial, agradeço:

À minha família, meus pais Regina e Claudio, minha irmã Susane e cunhado Jelther, que me deram muito apoio durante esses anos. Principalmente, agradeço os meus pais, que são os responsáveis pela minha formação como pessoa, e sempre me incentivaram.

À professora Camila Alves de Rezende, pela profícua didática, pela orientação e pelos ensinamentos que se somam desde quando a conheci na graduação. Principalmente, pelo alentador exemplo do que é ser um cientista. Muito obrigado pelo seu carinho e por nossa amizade.

Às professoras e aos professores que ajudaram a estruturar o meu caminho até aqui.

Aos meus amigos do LaQuiMoBio, por sempre “perderem” um tempo comigo durante o mestrado. Como colocou o escritor Fabricio Carpinejar, perder o tempo com alguém é a maior demonstração de afeto e gentileza, é se desatar da nossa rotina e não economizar esforços para ajudar o próximo. Muito obrigado, Eupídio; Camilla; Bruna Sussai; Elisa; Lidi; Sandra; Bruna Botelho; Andreza; José e Helena, pelos momentos produtivos que passamos juntos no laboratório, pelas discussões fundamentais que tivemos durante esses dois anos e pelos momentos de descontração, piqueniques, vinhos, cafés e comemorações.

Aos meus amigos da UNICAMP, que sempre estiveram presentes e me deram assistência durante esses anos de mestrado e na graduação. Vocês sempre me mostraram que a amizade tem um inexorável poder de florescer; assim como uma gentil flor que insiste em renascer toda primavera encantando os olhos daqueles que são capazes de perceber sua beleza.

À Claudia (Claudinha do laboratório institucional de espectroscopia) pela ajuda fundamental com os equipamentos. Ao Douglas, por ter me ajudado com as microscopias eletrônicas de transmissão. Aos técnicos(as) dos laboratórios institucionais do IQ, que sempre fizeram o máximo para nos auxiliar em nossas pesquisas. Ao pessoal do LNNano,

pelo apoio quando estive lá para fazer as medidas com o condutivímetro. Ao pessoal do lab D-205, que também sempre nos ajudaram com o empréstimo de equipamentos quando era preciso. Ao professor Matthieu Tubino, por ter gentilmente disponibilizado o espectrômetro de refletância difusa.

Às pessoas que buscam o bem comum, pessoal da manutenção, da limpeza, da segurança, que são importantíssimos para o desenvolvimento diário de nossas atividades na UNICAMP.

À Dra. Rubia Figueredo Gouveia, professora Ljubica Tasic e Dr. Oigres Daniel Bernardinelli pelas sugestões e conselhos que foram dados no exame de qualificação de área.

Ao professor Marcelo Ganzarolli de Oliveira, Dra. Rubia Figueredo Gouveia, professora Maria do Carmo Gonçalves, professora Maria Isabel Felisberti e professora Maria Helena Andrade Santana por terem aceitado o meu convite para compor a banca examinadora da dissertação de mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao INOMAT, pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao CNPq (projeto 420031/2018-9), pelo apoio financeiro.

À Fapesp (projetos 2018/23769-1 e 2016/13602-7), pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química da UNICAMP.

## RESUMO

Nanopartículas de lignina têm sido apresentadas como um importante viés para possibilitar o uso da lignina em materiais com alto valor agregado. No entanto, esta biomacromolécula ainda é bastante subutilizada em comparação com os outros produtos derivados do uso industrial de biomassas lignocelulósicas. Assim, neste trabalho, buscou-se isolar lignina da gramínea capim elefante (*Pennisetum purpureum*) aplicando uma extração sequencial ácido-base. A lignina isolada foi utilizada para obter nanopartículas de lignina e de acetato de lignina, cujas estabilidades coloidais, atividades antioxidantes e ação fotoprotetora em cremes dermocosméticos foram investigadas.

Resultados de ressonância magnética nuclear (NMR) mostraram que o pré-tratamento ácido-base foi eficiente no isolamento da lignina e impactou em moderadas modificações estruturais – comprovadas pela presença das unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) e da ligação  $\beta$ -O-4 da macromolécula. Microscopias eletrônicas (TEM e FESEM) comprovaram a obtenção de nanopartículas esféricas de lignina e de acetato de lignina pelo método da adição de não-solvente e nanopartículas de formato irregular pelo cisalhamento mecânico de agregados maiores de lignina. As nanopartículas obtidas apresentaram-se estáveis em uma ampla faixa de pH (5 – 11) e em força iônica inferior a 0,01.

As nanopartículas de lignina mostraram atividade antioxidante quatro vezes maior que o antioxidante comercial BHT e seis vezes maior que o antioxidante comercial BHA, sendo que o melhor valor determinado de concentração eficaz ( $EC_{50}$ ) foi de 0,011 mg mL<sup>-1</sup>. Os cremes preparados com incorporações maiores que 0,5 % (m/m) de nanopartículas de lignina apresentaram ação fotoprotetora frente à radiação UVA–UVB e visível, como também, fatores de proteção solar *in vitro* superiores a 6. Ao todo, este trabalho apresentou um método simples para o isolamento de lignina a partir do capim elefante e a obtenção de nanopartículas de lignina que podem ser aplicadas em dermocosméticos, devido às suas estabilidades coloidais, atividade antioxidante e ação fotoprotetora.

## ABSTRACT

Lignin nanoparticles have been considered as an important alternative to allow the use of lignin in materials with high added value. Notwithstanding, this biomacromolecule is still quite underutilized when compared to other products derived from the industrial use of lignocellulosic biomasses. Thus, in this work, lignin was isolated from elephant grass (*Pennisetum purpureum*) by applying a sequential acid-alkali extraction. The isolated lignin was used to obtain lignin and lignin acetate nanoparticles, which colloidal stabilities, antioxidant activities and photoprotective action in dermocosmetic creams were investigated.

Results of nuclear magnetic resonance (NMR) showed that the acid-alkali pretreatment was efficient in lignin isolation and led to moderate structural modifications – as evidenced by the presence of the structural subunits *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) and the  $\beta$ -O-4 linkage of the macromolecule. Electron microscopies (TEM and FESEM) proved the obtention of spherical lignin and lignin acetate nanoparticles, prepared by antisolvent addition. Also, the electron microscopies showed that nanoparticles with irregular morphology could be prepared by mechanical shearing of larger lignin aggregates. The nanoparticles prepared were stable in a wide pH range (5 - 11) and under ionic strength lower than 0.01.

Lignin nanoparticles showed antioxidant activity four times higher than the commercial antioxidant BHT and six times higher than BHA, with a best effective concentration ( $EC_{50}$ ) of 0.011 mg mL<sup>-1</sup>. The cream lotions that were prepared with the incorporation of lignin nanoparticle showed photoprotective action against UVA-UVB and visible radiation, as well as sun protection factors *in vitro* above 6 for concentrations greater than 0.5 wt. %. In an overall view, this work has presented a simple method for the isolation of lignin from elephant grass and lignin nanoparticles preparation that can be applied in dermocosmetics due to their colloidal stabilities, antioxidant activity and photoprotective action.

# Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática do conceito de uma biorrefinaria. Por meio de tratamentos químicos e físicos é possível converter os componentes da biomassa lignocelulósica em combustíveis, produtos químicos e materiais. Esquema com base na definição da OECD “*Meeting Policy Challenges for a Sustainable Bioeconomy*”.<sup>3</sup> .....21
- Figura 2.** Pirâmide de valor agregado aos produtos de uma biorrefinaria. Biocombustíveis devem ser produzidos em grandes quantidades para gerar lucro, já os produtos químicos de elevado valor agregado são produzidos em pequena quantidade. Adaptado de Costa e colaboradores.<sup>10</sup> .....22
- Figura 3.** Capim elefante (*Pennisetum purpureum*) utilizado neste trabalho colhido um ano após o plantio no Instituto de Zootecnia em Nova Odessa, SP, Brasil, 2017. ....24
- Figura 4.** Representação esquemática da composição majoritária da parede celular vegetal, constituinte da biomassa lignocelulósica. A parede celular é estruturada pelo arranjo das fibras de celulose quimicamente ligadas à hemicelulose e à lignina, formando um complexo lignocelulósico de alta coesão e dando resistência mecânica à parede. Adaptado de McAllister e colaboradores.<sup>26</sup> .....25
- Figura 5.** Representação esquemática (em apenas duas dimensões) da estrutura macromolecular da lignina de gramíneas, das respectivas unidades poliméricas e das ligações formadas entre elas. Adaptado de Figueiredo e colaboradores.<sup>19</sup> .....28
- Figura 6.** Principais métodos de extração de lignina da biomassa lignocelulósica que são aplicados industrialmente. Adaptado de Laurichesse e Avérous.<sup>28</sup> .....31
- Figura 7.** Esquema das rotas de conversão da lignina fracionada a partir da biomassa lignocelulósica em moléculas de importância econômica e materiais.<sup>19,27</sup> .....34
- Figura 8.** Esquema simplificado da ação dos antioxidantes preventivos e de quebra de cadeia para inibir a formação de radicais livres no organismo. Adaptado de Valgimigli e colaboradores.<sup>87</sup> .....41

<b>Figura 9.</b> Compostos fenólicos característicos encontrados em óleos essenciais que podem ser aplicados em produtos com atividade antioxidante. Os fenilpropanóides que compõem a lignina também podem ser substitutos dos antioxidantes sintéticos. <sup>87</sup> .....	43
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do mecanismo de depuração do radical DPPH* por compostos fenólicos. No método, acompanha-se a diminuição da banda de absorção do DPPH* (515 nm, cor violeta) com o tempo. ....	44
<b>Figura 11.</b> Fluxograma da metodologia adotada para o fracionamento e recuperação da lignina do capim elefante. ....	51
<b>Figura 12.</b> Representação de uma curva característica de titulação condutimétrica obtida experimentalmente para uma suspensão de nanopartículas de lignina. No início, ocorre neutralização de ácidos fortes e, no momento da neutralização de grupos ácidos fracos, a condutividade do meio mantém-se aproximadamente constante.....	53
<b>Figura 13.</b> Imagem do porta amostra contendo o filme (0,5 mm de espessura) de creme posicionado frontalmente ao feixe de luz incidente. O feixe, ao incidir na amostra, é refletido em vários ângulos (reflectância difusa) e os feixes refletidos chegam ao detector após serem novamente refletidos no interior da esfera de integração.....	55
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática da obtenção da série angular de imagens no microscópio eletrônico de transmissão.....	60
<b>Figura 15.</b> Esquema da hidrólise ácida das ligações glicosídicas da hemicelulose, representada pela cadeia de xilano, levando à formação de monossacarídeos representados pelas xiloses. <sup>113</sup> .....	61
<b>Figura 16.</b> Esquemas dos mecanismos de hidrólise básica das ligações C – O <b>a)</b> entre celulose e lignina e <b>b)</b> entre ligações éter arílicas na estrutura da lignina.....	62
<b>Figura 17.</b> Espectros de NMR <sup>13</sup> C em estado sólido (CPMAS) obtidos para a biomassa <i>in natura</i> , para os substratos isolados após o tratamento ácido ( <b>pós-ácido</b> ), básico ( <b>pós-básico</b> ) e o espectro obtido para a <b>lignina</b> isolada do capim elefante. Os números em preto indicam os sinais da celulose, em laranja, da hemicelulose e, em verde, os da lignina. ...	63
<b>Figura 18.</b> Teor de lignina na biomassa <i>in natura</i> , nos sólidos recuperados após cada etapa do pré-tratamento (pós-ácido e pós-básico) e pureza da lignina extraída. ....	65

<b>Figura 19.</b> Diagrama de correlação 2D $^{13}\text{C}(\text{F1}) - ^1\text{H}(\text{F2})$ HSQC da lignina isolada após o pré-tratamento ácido-base do capim elefante; os sinais em azul são positivos e os em vermelho são negativos. Os sinais identificados de 1 – 10 no espectro ampliado são atribuídos na Tabela 3. ....	66
<b>Figura 20.</b> Espectros de FTIR da lignina isolada do capim elefante e da lignina após a reação de acetilação (acetato de lignina). A banda em $1735\text{ cm}^{-1}$ no espectro do acetato de lignina indica a presença do grupo acetila. A ausência de uma banda alargada em $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ , no mesmo espectro, confirma que as hidroxilas presentes na estrutura da lignina foram acetiladas. ....	69
<b>Figura 21. a) e c)</b> Micrografias de FESEM das nanopartículas de lignina ( <i>LNP</i> ) e das nanopartículas de acetato de lignina ( <i>AcLNP</i> ), respectivamente – ambas foram preparadas pela adição de não-solvente; <b>b) e d)</b> micrografias de TEM das respectivas nanopartículas ( <i>LNP</i> e <i>AcLNP</i> ). A sequência ( <i>i – v</i> ) mostra a série angular de $-60^\circ$ a $+60^\circ$ para comprovar a presença de nanopartículas que apresentam estruturas do tipo “esfera oca”, as quais foram observadas e destacadas em <b>a) e b)</b> pelos quadrados tracejados. ....	71
<b>Figura 22.</b> Histogramas das distribuições de tamanhos das nanopartículas ( <i>LNP</i> e <i>AcLNP</i> ) preparadas pela adição de não-solvente. Os diâmetros foram medidos manualmente (500 partículas foram contabilizadas) nas micrografias de FESEM utilizando o software ImageJ®. Para as <i>LNPs</i> os diâmetros mínimo e máximo contabilizados foram 16 nm e 155 nm, e para as <i>AcLNPs</i> foram 22 nm e 209 nm. ....	75
<b>Figura 23.</b> Estudo da estabilidade das nanopartículas ( <i>LNP</i> e <i>AcLNP</i> ) frente à variação da força iônica e do pH do meio dispersante. As <i>LNPs</i> apresentaram ponto isoelétrico (IEP) no $\text{pH}=2,50$ e estabilidade para concentrações de NaCl inferiores a $0,01\text{ mol L}^{-1}$ e para valores de pH entre 4 e 12 ( $\zeta >  25\text{ mV} $ ). As <i>AcLNPs</i> apresentaram ponto isoelétrico (IEP) no $\text{pH}=3,86$ e estabilidade para concentrações de NaCl inferiores a $0,01\text{ mol L}^{-1}$ e para valores de pH entre 5 e 12 ( $\zeta >  25\text{ mV} $ ). As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas. ....	76
<b>Figura 24.</b> Micrografias de STEM das nanopartículas de lignina ( <i>LNP</i> ) com ajuste do pH do meio dispersante para $\text{pH}=2$ (nanopartículas coalescidas), $\text{pH}=7$ (nanopartículas estabilizadas pela ação de forças repulsivas) ou $\text{pH}=12$ (maior parte das <i>LNPs</i> são	

solubilizadas formando um filme ao secar, contendo partículas maiores remanescentes – indicadas pelas setas. A escala dessa micrografia é de 2  $\mu\text{m}$ , diferente das demais). .....77

**Figura 25. a)** Micrografia de FESEM das nanopartículas de lignina (*SLNP*) preparadas com o cisalhamento mecânico da suspensão tamponada em pH 7 de agregados de lignina; e **b)** micrografia de TEM das respectivas nanopartículas (*SLNP*). ..... 79

**Figura 26.** Histograma da distribuição de tamanhos das nanopartículas (*SLNP*) obtidas com o cisalhamento mecânico e comparação com a distribuição de tamanhos das *LNPs*. Os diâmetros foram medidos manualmente (500 partículas foram contabilizadas) nas micrografias de FESEM utilizando o software ImageJ®. Os diâmetros mínimo e máximo contabilizados para as *SLNPs* foram 17 nm e 214 nm, respectivamente. ....80

**Figura 27.** Estudo da estabilidade das nanopartículas (*SLNP*) frente à variação da força iônica e do pH do meio dispersante. As *SLNPs* apresentaram ponto isoelétrico (IEP) no pH=3,77 e estabilidade para concentrações de NaCl inferiores a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e para valores de pH entre 4,5 e 11 ( $\zeta > |25 \text{ mV}|$ ). O pH marcado como inicial é o pH da suspensão sem adição de tampão fosfato. Já para a investigação da força iônica o sistema foi tamponado em pH=7. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas. ....81

**Figura 28.** Representação esquemática dos possíveis mecanismos de captura do radical DPPH•: perda sequencial de próton e transferência de elétron **SPLET** (do inglês, *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*) e transferência acoplada de próton e elétron **PCET** (do inglês, *Proton-Coupled Electron Transfer*). O mecanismo **SPLET** pode prevalecer sobre o **PCET** em solventes polares ( $\text{H}_2\text{O}$ ) se o pH for básico. Em água e metanol, as fenoxilas da lignina estabelecem um equilíbrio de dissociação perdendo um próton (**PL**) levando à formação de ânions fenolatos. Esses ânions transferem um elétron (**ET**) para o radical **DPPH•** (cor púrpura) formando radicais fenoxila, que são estabilizados por ressonância. As espécies de **DPPH<sub>2</sub>** (cor amarela) são formadas na captura de um próton. Se a dissociação não ocorrer, o grupo fenólico reage com o radical DPPH• por meio de um mecanismo com transferência acoplada de próton (**PT**) e elétron (**PCET**). .....83

**Figura 29.** Representações gráficas dos percentuais de inibição radicalar (PI) em função da concentração inicial de nanopartículas de lignina (*SLNP*, *LNP* e *AcLNP*) que reagiram com o radical DPPH• em água. Os dados experimentais foram descritos pela função sigmóide

SGompertz utilizando o software OriginLab®. Os percentuais de inibição foram calculados após 16 min e 30 min de reação. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas.....85

**Figura 30.** Representações gráficas dos percentuais de inibição radicalar (PI) em função da concentração inicial das soluções de lignina e acetato de lignina em dioxano que reagiram com o radical DPPH\*. Os dados experimentais foram descritos pela função sigmóide SGompertz utilizando o software OriginLab®. Os percentuais de inibição foram calculados após 16 min e 30 min de reação. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas.....85

**Figura 31.** Comparação dos valores de RSI médios encontrados para a *LNP* e *SLNP* com valores reportados na literatura para os antioxidantes sintéticos (BHT e BHA) e para a vitamina E.<sup>90,128</sup> .....87

**Figura 32.** Espectros de transmitância na região do UV da base de creme pura (branco) e com incorporação crescente de nanopartículas de lignina (*LNP*, *SLNP* e *AcLNP*). Ao lado direito, tem-se as imagens dos cremes fotoprotetores preparados com suas respectivas concentrações percentuais. ....88

**Figura 33.** Espectro de transmitância na região do UVA – UVB (290 – 400 nm) e do visível (400 – 750 nm) de protetores comerciais (A, B e C de FPS 30) e dos cremes com incorporação de 10% (m/m) de nanopartículas de lignina (*LNP*, *SLNP* e *AcLNP*). A base de creme puro foi utilizada como branco.....90

**Figura 34.** Valores de FPS determinados a partir dos espectros de transmitância em função da concentração porcentual de nanopartículas de lignina (*LNP*, *SLNP* e *AcLNP*) incorporadas no creme não-iônico. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas. ....92

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Levantamento bibliográfico dos métodos reportados na literatura para o preparo de nanopartículas e nanoestruturas de lignina.....	38
<b>Tabela 2.</b> Atribuição dos sinais de ssNMR – $^{13}\text{C}$ (CPMAS) da biomassa <i>in natura</i> e da lignina isolada. As atribuições em laranja e verde são exclusivas da hemicelulose e da lignina, respectivamente. <sup>107</sup> .....	64
<b>Tabela 3.</b> Atribuição dos sinais de correlação $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ do espectro HSQC da lignina isolada do capim elefante. Os sinais 1 a 10 estão indicados na <i>Figura 19</i> . <sup>116</sup> .....	67
<b>Tabela 4.</b> Caracterização da lignina. As quantidades de grupos hidroxilas (aromáticas e alifáticas) e metoxilas foram determinadas por NMR de $^1\text{H}$ quantitativo. A massa molar numérica média (Mn) e a massa molar ponderal média (Mw) foram estimadas por cromatografia de permeação em gel. ....	68
<b>Tabela 5.</b> Concentração total de grupos ionizáveis (ácidos fortes e fracos) presentes na superfície das nanopartículas de lignina ( <i>LNP</i> e <i>AcLNP</i> ) e na superfície da lignina bulk ( $10^2$ – $10^3$ $\mu\text{m}$ ) em suspensão. As concentrações foram determinadas por titulação condutimétrica.....	74
<b>Tabela 6.</b> Resultados da atividade antioxidante das nanopartículas ( <i>LNP</i> , <i>SLNP</i> e <i>AcLNP</i> ) e das soluções de lignina e de acetado de lignina para os tempos de reação de 16 min e 30 min. Os parâmetros da atividade antioxidante são a concentração eficaz para inibição radicalar de 50% ( $\text{EC}_{50}$ ) e o índice de eliminação radicalar (RSI).....	86
<b>Tabela 7.</b> Estimativa dos valores de FPS multiplicados pelo fator 2,40 para os três cremes preparados com incorporação crescente (em porcentagem) das nanopartículas ( <i>LNP</i> , <i>SLNP</i> e <i>AcLNP</i> ).....	94

# Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Biorrefinaria e produtos com valor agregado.....	20
1.2 A biomassa lignocelulósica.....	23
1.2.1 O Capim Elefante.....	23
1.2.2 Composição.....	25
1.3 A Lignina.....	26
1.3.1 Estrutura.....	27
1.3.2 Propriedades.....	30
1.3.3 Métodos de fracionamento da lignina.....	30
1.3.4 Produtos a partir da lignina.....	33
1.4 Nanopartículas de Lignina.....	35
1.4.1 Métodos de preparo e estruturas reportadas.....	37
1.4.2 Potenciais aplicações.....	39
1.5 Antioxidantes inspirados na natureza.....	41
1.5.1 Sobre os antioxidantes.....	41
1.5.2 Sobre os métodos de determinação de atividade antioxidante.....	43
1.6 Um protetor solar inspirado na natureza.....	44
1.7 Nanotecnologia aplicada em cosméticos.....	46
2. OBJETIVOS.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49

<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>50</b>
3.2.1	Pré-tratamento da Biomassa: Fracionamento e Recuperação da Lignina.....	50
3.2.2	Acetilação da Lignina .....	51
3.2.3	Obtenção das Nanopartículas de Lignina.....	51
3.2.4	Titulação Condutimétrica .....	52
3.2.5	Avaliação da Atividade Antioxidante .....	53
3.2.6	Incorporação das Nanopartículas de Lignina em Base de Creme Puro e Avaliação do Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> .....	54
<b>3.3</b>	<b>Caracterizações</b> .....	<b>55</b>
3.3.1	Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido (SSNMR) .....	55
3.3.2	Determinação da Composição de Lignina nos Sólidos Obtidos após Cada Etapa do Pré-tratamento e Pureza da Lignina. ....	56
3.3.3	NMR 2D de Correlação a Uma Ligação (HSQC) .....	56
3.3.4	NMR de <sup>1</sup> H Quantitativo.....	57
3.3.5	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) .....	58
3.3.6	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	58
3.3.7	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta .....	58
3.3.8	Estudo da Estabilidade das Nanopartículas em Função da Força Iônica do Meio.....	58
3.3.9	Estudo da Estabilidade das Nanopartículas em Função do pH do Meio e Determinação do Ponto Isoelétrico .....	59
3.3.10	Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (FESEM).....	59
3.3.11	Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM) .....	59
3.3.12	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) .....	60
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Fracionamento e Caracterização da Lignina do Capim Elefante</b> .....	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Lignina</b> .....	<b>70</b>

4.2.1 Auto-organização Induzida pela Adição de Não-Solvente (Água).....	70
4.2.2 Nanopartículas Obtidas com Cisalhamento Mecânico.....	78
<b>4.3 Estudo da Atividade Antioxidante da Lignina em Solução e das Nanopartículas de Lignina.....</b>	<b>82</b>
<b>4.4 Estudo da Absorção UVA–UVB de Cremes com Nanopartículas de Lignina .....</b>	<b>88</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>

# 1. Introdução

## 1.1 Biorrefinaria e produtos com valor agregado

É notório que nossa posição com relação ao meio ambiente deva evoluir para uma abordagem mais sustentável até a metade do séc. XXI, na tentativa de amenizar os problemas ambientais contemporâneos. Segundo o relatório Brundtland – Nosso Futuro Comum – para alcançarmos um desenvolvimento sustentável, precisamos “satisfazer as necessidades presentes, sem comprometer a capacidade das gerações futuras de suprir suas próprias necessidades”.<sup>1</sup> Esse é, provavelmente, uns dos principais desafios que nossa comunidade global enfrentará nos próximos 30 anos, diante do aumento na demanda por alimentos, produtos, energia e água potável.<sup>2,3</sup> Principalmente, com a expectativa de aumento de 2,3 bilhões de pessoas no globo até 2050 e, acompanhando essa tendência, o crescimento vertiginoso do Produto Interno Bruto (PIB) das nações em rota de desenvolvimento econômico e dos países integrantes da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*).<sup>2</sup>

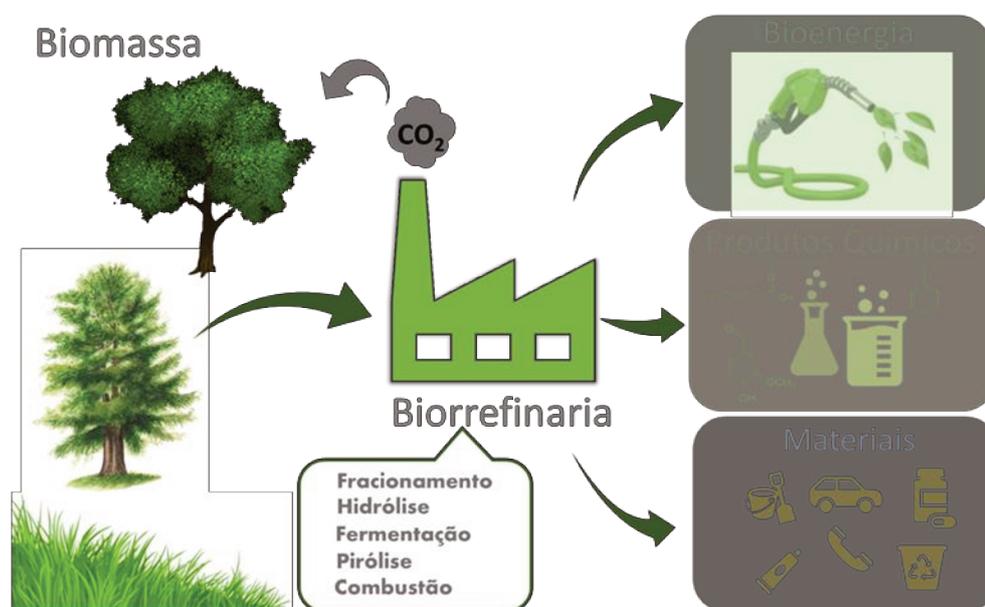
Neste âmbito, é importante adotar uma abordagem econômica que culmine no desenvolvimento de produtos, processos e serviços mais sustentáveis a partir da transformação e do uso de resíduos alimentares, biomassa lignocelulósica e produtos geneticamente modificados. Assim, cunha-se o termo *bioeconomia*<sup>§</sup> como a tentativa de unir os setores agroindustriais e químicos, visando o crescimento econômico em consonância com a manutenção do ecossistema.<sup>4-6</sup>

Uma das principais narrativas da bioeconomia tem como foco o desenvolvimento de biorrefinarias, que são sistemas integrados baseados na

---

<sup>§</sup> *Bioeconomia*, de acordo com a Agência Internacional de Energia (IEA), é uma parte da economia que tem como foco o lucro gerado a partir de recursos biológicos (biomassa) por meio da produção de produtos de valor agregado, como alimentos; materiais; combustíveis; produtos químicos; produtos biológicos e bioenergia.

transformação econômica e sustentável da biomassa lignocelulósica em energia, produtos químicos e materiais com valor agregado (*Figura 1*).<sup>4,7</sup> Sumariamente, o conceito de biorrefinaria assemelha-se bastante com o da tradicional refinaria de petróleo, salvo o fato de que a fonte de carbono das biorrefinarias é a biomassa vegetal, que é renovável. Assim, na biorrefinaria, os produtos são obtidos a partir do fracionamento e da desfuncionalização das moléculas que compõem a biomassa lignocelulósica.

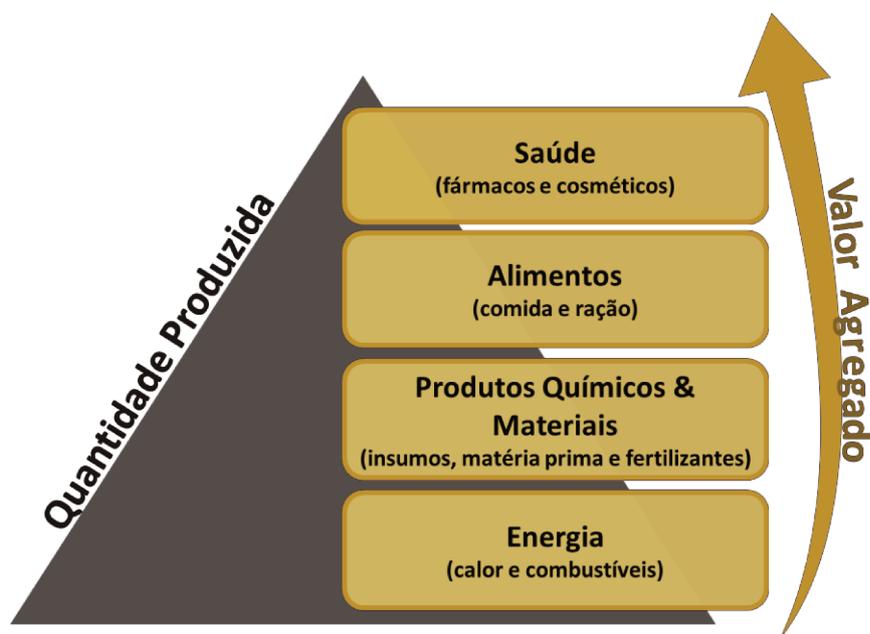


**Figura 1.** Representação esquemática do conceito de uma biorrefinaria. Por meio de tratamentos químicos e físicos é possível converter os componentes da biomassa lignocelulósica em combustíveis, produtos químicos e materiais. Esquema com base na definição da OECD “*Meeting Policy Challenges for a Sustainable Bioeconomy*”.<sup>3</sup>

Idealmente, as biorrefinarias devem explorar todos os componentes da biomassa, por exemplo, as biorrefinarias de biocombustíveis podem utilizar os resíduos da produção de bioenergia para obter produtos químicos e materiais com valor agregado, bem como produzir energia que possa alimentar todo o processo.<sup>4,8</sup> Essa estratégia integrada, permitirá que as biorrefinarias se tornem uma alternativa mais rentável que as refinarias atuais de petróleo, isso associado à tendência de aumento do preço do barril de petróleo nos próximos anos.<sup>9</sup>

Como exemplo de alternativa para tornar o processo rentável pode-se, primeiramente, extrair da biomassa produtos químicos de alto valor agregado, como moléculas utilizadas em fármacos, fragrâncias, aromatizantes e produtos aplicados na

indústria de alimentos e cosméticos. Uma vez que estes valiosos extrativos são retirados, a biorrefinaria terá como foco o processamento dos polissacarídeos para produção de biocombustíveis. Esta abordagem é necessária, pois, como apresentado na *Figura 2*, produtos que são aplicados em setores da química fina como em alimentos, cosméticos e fármacos têm alto valor agregado e podem contribuir para o custeio e lucro das biorrefinarias no futuro.



**Figura 2.** Pirâmide de valor agregado aos produtos de uma biorrefinaria. Biocombustíveis devem ser produzidos em grandes quantidades para gerar lucro, já os produtos químicos de elevado valor agregado são produzidos em pequena quantidade. Adaptado de Costa e colaboradores.<sup>10</sup>

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados visando à utilização dos resíduos da produção de biocombustíveis ou ao aproveitamento dos componentes da biomassa para a obtenção de materiais funcionais ou produtos com valor agregado.<sup>11,12</sup> Por exemplo, bastante enfoque tem sido dado aos materiais preparados a partir da celulose, como os nanomateriais de celulose, que apresentam numerosas aplicações em produtos como adesivos, tintas, nanocompósitos, filmes transparentes, membranas, espumas, cosméticos e outros.<sup>13</sup> Consequentemente, a celulose apresenta um enorme potencial de valor econômico adicionado à operação de uma biorrefinaria.

A lignina, por sua vez, também pode ser um produto chave para a viabilidade econômica das biorrefinarias, visto que ela é um resíduo sólido dos pré-tratamentos da

biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração e para a obtenção de materiais de celulose.<sup>14</sup> Entretanto, ao contrário da celulose, o desenvolvimento de produtos e materiais mais elaborados a partir da lignina ainda está em sua gênese.<sup>15</sup> Dessa forma, é importante investigar métodos de extração de lignina a partir de potenciais biomassas, bem como obter informações acerca de sua estrutura, de que modo, a partir dela, seja possível desenvolver novos produtos funcionais ou substituir aqueles que hoje são provenientes de fontes não renováveis.

## 1.2 A biomassa lignocelulósica

Biomassas lignocelulósicas constituem diversos tipos de matéria orgânica proveniente de fontes vegetais, de resíduos agroindustriais e da indústria alimentícia, como folhas, caules, bagaços e cascas derivados do processamento de culturas como milho, cana, eucalipto, arroz, laranja, coco entre outras. Essas biomassas vêm sendo apresentadas como importantes contribuintes para o desenvolvimento das biorrefinarias e de uma sociedade industrial mais sustentável.<sup>7,16-18</sup>

### 1.2.1 O Capim Elefante

Dentre as potenciais fontes renováveis para a obtenção de lignina, as mais promissoras são aquelas derivadas de processos integrados da conversão da biomassa em combustíveis, as que não são fonte de alimentos, juntamente com a recuperação de lignina durante a extração de celulose na indústria de papel.<sup>19</sup>

Estudos recentes mostraram que gramíneas perenes, como o capim elefante (*Figura 3*) – também conhecido como capim napier (*Pennisetum purpureum*) –, apresentam um grande potencial de aplicação na matriz energética brasileira para produção de bioetanol, servindo como substitutos do bagaço de cana-de-açúcar nos períodos de entressafra, quando a produção de cana é interrompida. Adicionalmente, o capim elefante apresenta alta produtividade por hectare (aprox. 88 Mton ha<sup>-1</sup>), baixa demanda por nutrientes e não requer o uso de pesticidas e nem de fertilizantes para ser cultivado, sendo uma vantagem frente ao cultivo de cana-de-açúcar.<sup>16,20,21</sup>

O capim é uma planta de fotossíntese  $C_4$  e tem morfologia bastante semelhante à da cana-de-açúcar, razão pela qual é possível propor o seu uso em refinarias já existentes, que fazem o uso do bagaço de cana-de-açúcar como matéria prima do processo de produção de etanol lignocelulósico.<sup>20</sup> O capim poderia ser introduzido no processo, portanto, nos períodos de entressafra da cana, permitindo, assim, a operação contínua das biorrefinarias em todo ano.



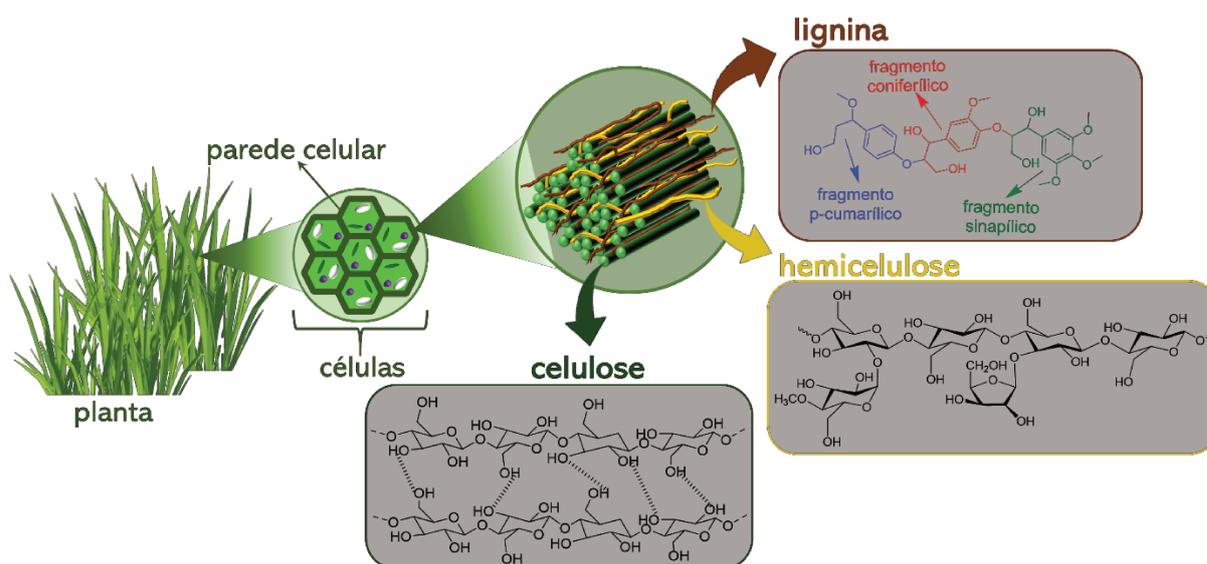
**Figura 3.** Capim elefante (*Pennisetum purpureum*) utilizado neste trabalho colhido um ano após o plantio no Instituto de Zootecnia em Nova Odessa, SP, Brasil, 2017.

Trabalhos recentes mostraram que o capim elefante é uma biomassa muito promissora para a produção de etanol lignocelulósico, bem como para a produção de nanocristais de celulose para serem aplicados na preparação de nanocompósitos poliméricos.<sup>22</sup>

Até então, há somente um trabalho reportado na literatura apresentando estratégias de deslignificação do capim elefante, no entanto, o enfoque dado foi na otimização do processo de produção de açúcares fermentáveis e não na recuperação e utilização da lignina.<sup>23</sup> Portanto, este trabalho de mestrado é o primeiro a apresentar uma estratégia de extração de lignina do capim elefante visando a sua aplicação como material de valor agregado.

### 1.2.2 Composição

A parede celular dos vegetais é constituída, principalmente, por celulose, hemicelulose, lignina (*Figura 4*) e componentes minoritários como vitaminas, ácidos graxos, proteínas, essências, corantes e compostos inorgânicos.<sup>24</sup> As proporções desses componentes nas plantas dependem de fatores biológicos e físicos como tipo, órgãos, idade e meio de cultivo da planta.<sup>25</sup>



**Figura 4.** Representação esquemática da composição majoritária da parede celular vegetal, constituinte da biomassa lignocelulósica. A parede celular é estruturada pelo arranjo das fibras de celulose quimicamente ligadas à hemicelulose e à lignina, formando um complexo lignocelulósico de alta coesão e dando resistência mecânica à parede. Adaptado de McAllister e colaboradores.<sup>26</sup>

Dentre os componentes majoritários, a celulose representa cerca de 40% a 50% da massa da parede celular e é um homopolímero linear. Este biopolímero é formado pela união de celobioses (dímeros de anidroglicoses) resultando em ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  e cadeias longas (2000 a 25000 monômeros). Além das ligações covalentes, as cadeias de celulose podem formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Cerca de 36 cadeias de polímero são unidas por ligações intermoleculares formando estruturas bastantes ordenadas conhecidas como fibrilas elementares – apresentando domínios cristalinos interceptados por regiões amorfas.<sup>24</sup> As fibrilas, por sua vez, agrupam-se em fibras maiores (microfibrilas), que são responsáveis pela estruturação mecânica da parede celular junto com a hemicelulose e a lignina, como apresentado na *Figura 4*.

As hemiceluloses (10 – 40% em massa da parede celular), também são compostas por polissacarídeos, mas são heteropolímeros ramificados, contendo glicose e outras hexoses e pentoses (como D-galactose, D-fucose, D-manose, D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos. Esses polissacarídeos são de cadeias pequenas (500 a 3000 monômeros), organizam-se em fibrilas totalmente amorfas e, por isso, são facilmente hidrolisadas por ácidos e bases diluídos, ao contrário das regiões cristalinas da celulose que não são permeadas pela água.<sup>15,24</sup>

A lignina compõe cerca de 15 – 30% em massa da parede celular e, diferentemente dos polissacarídeos, é uma macromolécula constituída de fenilpropanóides, os quais estão ligados entre si por meio de ligações éter e éster benzílicas.<sup>15,27</sup> Uma abordagem mais aprofundada acerca da estrutura da lignina e suas ligações características serão apresentadas nas sessões seguintes.

### 1.3 A Lignina

Dentre os co-produtos derivados da produção de biocombustíveis e da utilização de biomassa lignocelulósica na indústria de papel, a lignina tem sido citada como uma importante biomacromolécula, com potencial de valorização econômica.<sup>27</sup> A lignina é a fonte de estruturas aromáticas mais abundante na Terra e sua produção mundial, como resíduo da indústria de papel e polpa, chega a ser maior que 70 milhões de toneladas ao ano.<sup>28,29</sup> Tipicamente, ela tem sido utilizada na indústria de papel para a geração de energia por sua combustão. Simultaneamente, o aumento na produção de etanol lignocelulósico deverá levar a um aumento na produção de lignina e seu aproveitamento contribuirá, inclusive, para a viabilidade econômica das biorrefinarias.<sup>27</sup>

Neste cenário, tecnologias aprimoradas para o isolamento da lignina e a investigação de suas características físico-químicas são imperativas para permitir o uso deste abundante material renovável, que ainda é bastante subutilizado. Somente cerca de 5% da lignina produzida mundialmente é utilizada em produtos com valor agregado, como aditivos para concreto<sup>30</sup>, emulsificantes<sup>27</sup>, materiais adsorventes<sup>31</sup>, aditivo em compósitos poliméricos<sup>32</sup>, adesivos<sup>31,33</sup>, dispersantes e surfactantes<sup>34</sup>. Ainda assim, a lignina apresenta um enorme potencial para tornar-se uma matéria prima chave, a qual pode ser

transformada em diversos produtos, por meio de sua aplicação direta ou despolimerização.<sup>32</sup>

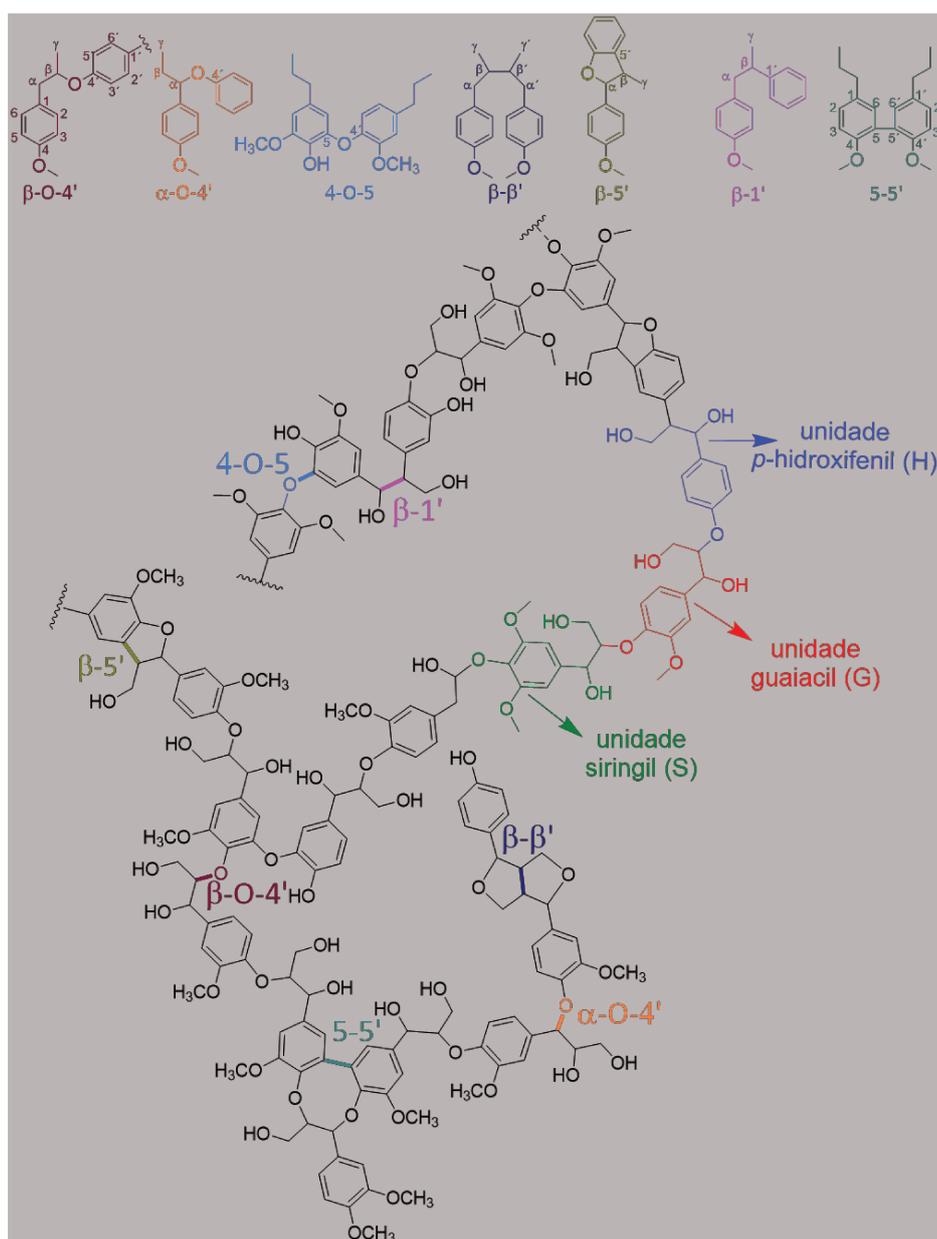
Devido à sua estrutura complexa e heterogênea, esforços têm sido direcionados no estudo da rede macromolecular da lignina de diferentes plantas e na investigação de processos de extração, visando propiciar seu uso como matéria-prima rentável.<sup>35</sup> Neste sentido, o conhecimento sobre as mudanças estruturais impactadas por diferentes processos de deslignificação é um ponto-chave, para permitir o uso da lignina na produção de produtos químicos, bem como sua aplicação como material de valor agregado.

### 1.3.1 Estrutura

As unidades formadoras da lignina são os fenilpropanóides álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A biossíntese desses monolignóis ocorre com a redução dos respectivos grupos ácidos pela molécula NADPH. Já a estrutura macromolecular é sintetizada nas plantas por meio de um mecanismo de polimerização desidrogenativa (mediada por enzimas) dos monolignóis dando origem às unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) da lignina.<sup>24</sup>

Sabe-se que as unidades da lignina diferem no grau de formação de ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio dependendo se foi produzida em angiospermas (*hardwood*), gimnospermas (*softwood*) ou gramíneas, por exemplo. Em angiospermas, tipicamente, há uma proporção 1:1 de unidades guaiacil e siringil e, em gimnospermas, a proporção chega a ser 9:1 de unidades guaiacil e siringil. Já as gramíneas apresentam as três unidades com proporções de, aproximadamente, 1:7:2 de *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil, respectivamente.<sup>27</sup> Essas proporções impactam diretamente nas quantidades de ligações C-C e C-O na molécula e, por consequência, na susceptibilidade a ataques químicos.<sup>36</sup>

Na *Figura 5*, são apresentadas as ligações características que são formadas entre as unidades da macromolécula durante a biossíntese, as quais são divididas em ligações éter arílicas ( $\alpha$ -O-4' e  $\beta$ -O-4'), difenil éter (4-O-5), resinóicas ( $\beta$ - $\beta'$ ), fenilcumaranas ( $\beta$ -5'), bifenilas (5-5') e 1,2-diarilpropanas ( $\beta$ -1'). Dentre essas ligações, a mais predominante é a éter arilglicerol- $\beta$ -arila ( $\beta$ -O-4'), representando cerca de 40 – 60% do total de ligações entre as unidades. Por consequência, a ligação ( $\beta$ -O-4') é o principal alvo de estudo para acompanhar mudanças estruturais que ocorrem durante o fracionamento da lignina.<sup>27</sup>



**Figura 5.** Representação esquemática (em apenas duas dimensões) da estrutura macromolecular da lignina de gramíneas, das respectivas unidades poliméricas e das ligações formadas entre elas. Adaptado de Figueiredo e colaboradores.<sup>19</sup>

Tipicamente, a lignina é considerada como uma macromolécula amorfa com um arranjo tridimensional randômico de suas unidades na parede celular. As evidências que suportam esse paradigma são o fato da lignina não ser opticamente ativa (comportamento isotrópico de interação com a luz), ser insolúvel na planta e, de acordo com a teoria de Flory de polimerização trifuncional, as cadeias reticuladas em três dimensões, ao serem degradadas, produzem fragmentos de baixa massa molecular (solúveis em meio ácido) e fragmentos de alta massa molecular.<sup>37</sup>

Em 1989, Goring apresentou uma modificação do modelo de arranjo randômico das unidades da lignina. O seu principal argumento foi fundamentado na macroestrutura dos polissacarídeos na parede celular: “...como a lignina pode ser considerada como uma rede aleatória, quando ela é a imagem espelhada em escala molecular da ultraestrutura do polissacarídeo altamente organizado?”.\*\* Sabe-se que o arranjo das microfibrilas de celulose é ordenado, assim foi proposto que a lignina se alinha na direção longitudinal acompanhando a orientação das microfibrilas na parede celular das plantas.<sup>38</sup>

Ademais, pensando na estrutura lamelar da lignina na parede secundária das células, sua espessura é de ~2 nm o que permite a disposição de até 4 unidades H, G, S, conseqüentemente, este espaço restrito impõe um alinhamento preferencial às macromoléculas, direcionadas tangencialmente à parede secundária.<sup>38</sup> Posteriormente, em 1994, Hatcher e Faulon realizaram cálculos computacionais que indicaram uma estrutura helicoidal – característica de macromoléculas sintetizadas naturalmente – para o arranjo tridimensional da lignina. Eles propuseram ainda que o eixo da hélice se encontra em paralelo com as fibrilas de celulose.<sup>39</sup>

Hoje, considera-se que a lignina apresenta uma estrutura tridimensional heterogênea na região interlamelar e, na parede secundária das células, ela apresenta uma estrutura helicoidal paralela ao eixo das microfibrilas.<sup>27</sup> No entanto, ainda não há um maior refinamento na compreensão de sua estrutura, principalmente em função da

---

\*\* Tradução livre do inglês: “...how can lignin be regarded as a random network when it is the mirror image on a molecular scale of the highly organized polysaccharide ultrastructure?”

dificuldade de extrair a lignina e preservar as características de sua estrutura inicial na planta.

### 1.3.2 Propriedades

Um dos principais papéis da lignina nas plantas é conferir resistência mecânica devido à presença de anéis aromáticos e de ligações cruzadas em sua estrutura.<sup>24,32</sup> Ademais, a lignina tem um papel importante no controle do fluxo de fluidos na parede celular e proteção contra estresses bioquímicos.<sup>24,40</sup> A macromolécula também atua na proteção das plantas frente à radiação solar de alta frequência, devido à presença de ligações conjugadas, que são cromóforos absorvedores de radiação UVA e UVB.<sup>41</sup>

Como apresentado anteriormente, a lignina também possui uma estrutura rica em grupos fenólicos, que também são gerados na cisão das ligações éter arílicas e difenil éter durante o fracionamento da macromolécula. A presença de hidroxilas fenólicas confere à lignina a capacidade de depurar radicais livres e atuar como antioxidante. Esta propriedade tem sido bastante investigada na literatura e será abordada com mais detalhes nas próximas sessões.<sup>40</sup>

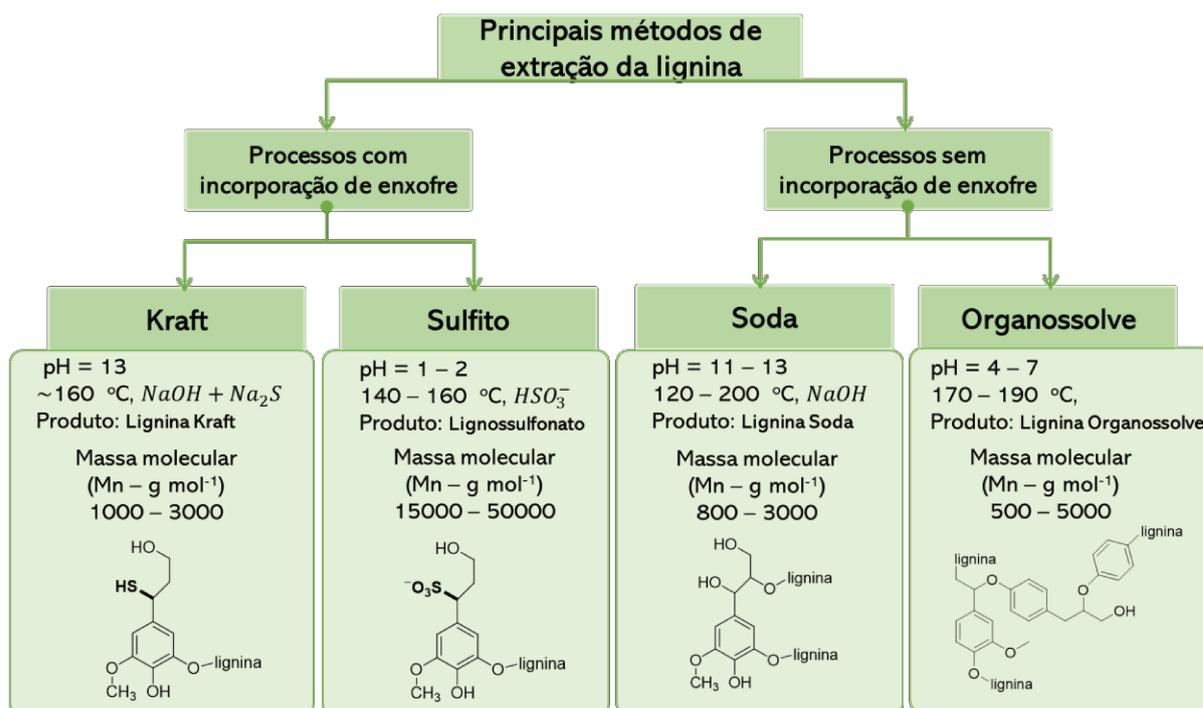
As propriedades físico-químicas da lignina estão diretamente relacionadas à sua estrutura que é, também, impactada pelos métodos de extração empregados.<sup>42,43</sup> Durante a extração, podem ocorrer processos químicos que levam à sua modificação molecular e estrutural; como a quebra de ligações, formação de novas ligações carbono-oxigênio e inserção de novos grupos funcionais (proveniente dos reagentes) na estrutura da macromolécula.<sup>27</sup> Assim, é possível modular as propriedades da lignina pensando, também, nos métodos de fracionamento aplicados.

### 1.3.3 Métodos de fracionamento da lignina

A lignina pode ser extraída da biomassa lignocelulósica por tratamentos físicos, químicos e/ou bioquímicos. Em geral, os tratamentos químicos levam à quebra de ligações éster e éter entre a lignina e os polissacarídeos da parede celular e, também, das ligações

éter arílicas e difenil éter da estrutura macromolecular da lignina – resultando na formação de fragmentos de menor massa molecular.<sup>19,35</sup>

Os métodos mais comuns reportados na literatura para o fracionamento da lignina são: 1. Kraft; 2. Sulfito; 3. Soda e 4. Organossolve (*Figura 6*). Atualmente, os processos Kraft e Sulfito são os mais utilizados nas indústrias para a deslignificação da madeira, no entanto, a lignina obtida por esses métodos não é pura e contém elevadas quantidades de enxofre, o que limita o seu leque de aplicações.<sup>32,43</sup>



**Figura 6.** Principais métodos de extração de lignina da biomassa lignocelulósica que são aplicados industrialmente. Adaptado de Laurichesse e Avérous.<sup>28</sup>

No método Kraft, o fracionamento da lignina ocorre via digestão química da parede celular com uma solução aquosa contendo hidróxido de sódio e sulfito de sódio.<sup>32</sup> A reação ocorre em elevadas temperaturas (~160 °C) e resulta em fragmentos de baixa massa molecular com grupos tióis em suas estruturas (*Figura 6*).

Já no método sulfito, a lignina é extraída também por digestão química, mas com uma solução aquosa contendo dióxido de enxofre – levando à formação de ácido sulfuroso no meio – e contra-íons (cálcio, sódio, magnésio ou amônio) na forma de hidróxidos ou carbonatos.<sup>43</sup> O processo de deslignificação ocorre também em elevadas

temperaturas (140 – 160 °C), mas os fragmentos formados (lignossulfonatos) apresentam elevada massa molecular, como apresentado na *Figura 6*. Os lignossulfonatos formados no processo têm grupos sulfatos que tornam os fragmentos solúveis em água.<sup>32</sup>

No método soda, a deslignificação da biomassa ocorre em meio alcalino (pH entre 11 e 13) com adição de NaOH (2 a 15 % m/v) e, assim como no método Kraft, a lignina extraída apresenta baixa massa molecular. Contudo, a lignina soda não apresenta enxofre em sua estrutura visto que não há adição de Na<sub>2</sub>S durante o tratamento. A lignina soda também pode sofrer reações de oxidação durante a digestão química em meio alcalino levando ao aumento da quantidade de grupos carboxílicos em sua estrutura.

Já no método organossolve a lignina é extraída com o emprego de solventes orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico, etanol e outros. A lignina recuperada do tratamento organossolve sofre pouca modificação estrutural e os fragmentos obtidos apresentam valores de massa molecular em média maiores que os fragmentos obtidos pelo método soda.<sup>43,44</sup>

Dentre os métodos apresentados, o soda e o organossolve são os que permitem a obtenção de lignina mais pura (valores superiores a 85%), sem presença de enxofre na estrutura e com bons rendimentos (valores superiores a 50% m/m), razão pela qual ambos têm sido estudados para o fracionamento da lignina de diferentes biomassas e posterior despolimerização ou aplicação na produção de materiais.<sup>44</sup>

Apesar da existência de métodos de extração de lignina já bem estabelecidos na literatura, é importante ressaltar que não há uma única estratégia para lidar com os obstáculos inerentes aos diferentes tipos de biomassa e, por isso, é importante investigar os efeitos dos métodos de fracionamento da lignina em função das variedades das plantas.<sup>43</sup> Ademais, ainda há poucos trabalhos reportados na literatura cujo propósito seja o estudo da extração de lignina visando a sua recuperação e análise estrutural para a produção de materiais funcionais como as nanopartículas de lignina. A análise dos resultados para a pesquisa das palavras-chave “*lignin extraction*” refinada pelo tópico “*lignin nanoparticles*” na base de dados Web of Science mostra que, dos 40 resultados

encontrados, apenas sete artigos abordam diretamente métodos de extração de lignina de biomassas lignocelulósicas para produção de nanopartículas de lignina.<sup>45</sup>

No processo de extração da lignina da biomassa lignocelulósica, a ligação em maior quantidade ( $\beta$ -O-4') é quebrada, levando a fragmentos com elevadas quantidades de grupos fenólicos, o que resulta no caráter anfifílico dos fragmentos e a solubilidade em meio alcalino, devido à formação de ânions fenolatos em pH básico. Já os outros tipos de subestruturas da lignina com ligações resinóicas ( $\beta$ - $\beta'$ ), fenilcumaranas ( $\beta$ -5') e 1,2-diarilpropanas ( $\beta$ -1') não sofrem nenhum tipo de fragmentação. Dependendo do tratamento, as ligações difenil éter (4-O-5) e bifenilas (5-5') podem ou não serem fragmentadas.<sup>27,43,46</sup>

É importante levar em consideração como os processos de deslignificação da biomassa fragmentam a lignina, pois a estrutura dos fragmentos é diretamente dependente das condições físico-químicas dos tratamentos.<sup>19</sup> Dessa forma, as propriedades da lignina recuperada estão relacionadas com as modificações estruturais causadas pelos tratamentos. Assim, é possível aplicar diferentes condições de deslignificação de modo a obter fragmentos de lignina com propriedades específicas que determinarão sua aplicação futura como material.

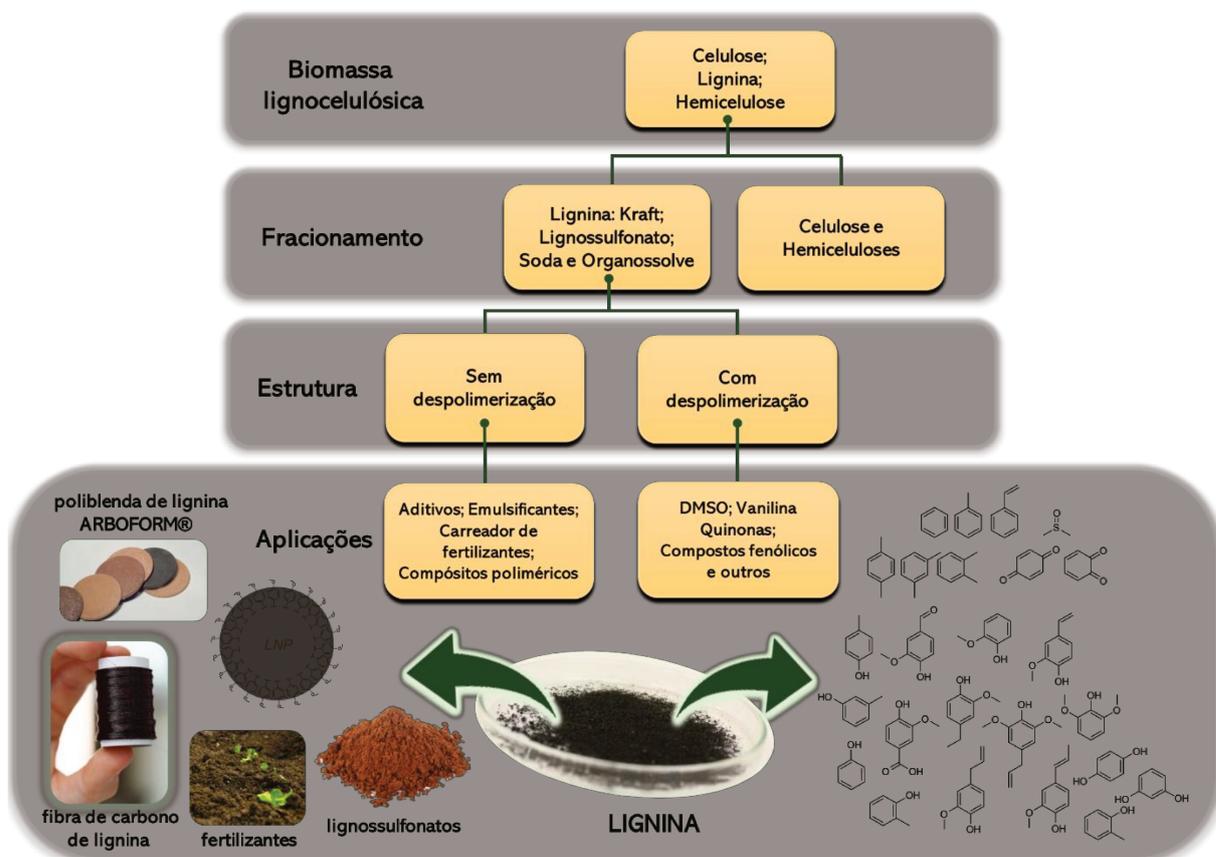
Neste trabalho de mestrado, optou-se pela aplicação de um pré-tratamento ácido seguido de um tratamento com hidróxido de sódio visando à obtenção de uma lignina mais pura. Isto porque, o tratamento Soda, quando aplicado sozinho, resulta em um licor básico que contém, além das macromoléculas fragmentadas de lignina, também outros componentes, como extrativos e produtos de degradação da hemicelulose, os quais podem ser impurezas dependendo da aplicação final da lignina.

#### 1.3.4 Produtos a partir da lignina

Esforços têm sido direcionados no aproveitamento direto da lignina por meio de sua aplicação como material de valor agregado ou por meio de sua despolimerização para obtenção de produtos químicos chave, como apresentado na *Figura 7*. A macromolécula pode ser fragmentada permitindo a obtenção de compostos de massas

moleculares menores como vanilina, fenóis, benzenos substituídos, quinonas, DMSO e outros.<sup>27,42,47</sup> A fragmentação desses produtos pode ser feita por meio de pirólise, despolimerização catalisada por ácidos ou bases, oxidação, conversão microbiana e hidrólise enzimática.<sup>43</sup> A vanilina, por exemplo, já é produzida em escala industrial a partir da lignina por um mecanismo de despolimerização oxidativa, sendo uma vantagem frente ao método tradicional que parte do fenol proveniente do petróleo.<sup>48</sup>

No entanto, os produtos que são obtidos a partir da fragmentação da lignina, hoje, ainda são mais custosos que os análogos obtidos a partir do petróleo. Por exemplo, o preço de mercado da vanilina proveniente do petróleo é de 10 \$ Kg<sup>-1</sup>, já o valor da vanilina obtida a partir da macromolécula é quase o dobro.<sup>49,50</sup> Isto posto, é necessário desenvolver metodologias de despolimerização da lignina que sejam mais rentáveis, ou até mesmo, aplicar rotas que promovam a quebra seletiva das ligações com o uso de catalisadores homogêneos ou heterogêneos.<sup>51</sup>



**Figura 7.** Esquema das rotas de conversão da lignina fracionada a partir da biomassa lignocelulósica em moléculas de importância econômica e materiais.<sup>19,27</sup>

Em função dos entraves relacionados à despolimerização da lignina em escala industrial, uma solução a curto prazo para elevar a sua importância econômica é a produção de materiais a partir dos fragmentos de lignina. Atualmente, a lignina já é utilizada como aditivo em produtos, por exemplo, cerca de 50% da produção mundial de lignossulfonatos é utilizada em misturas de concretos, visto que a lignina atua como plastificante e retarda o processo de endurecimento da pasta de cimento.<sup>30</sup> A lignina também é utilizada como aglutinante de ração animal, na formulação de pesticidas, carreador de fertilizantes, carvão ativo e outros.<sup>52</sup>

Visando uma aplicação da macromolécula com maior valor agregado, tem-se buscado a produção de materiais mais elaborados como, por exemplo, copolímeros à base de lignina, compósitos poliméricos, resinas, espumas e nanopartículas de lignina. Satio e colaboradores desenvolveram poliuretanas termoplásticas com elevado conteúdo de lignina (aprox. 75% em massa), permitindo uma utilização da lignina para obtenção de um produto com valor agregado.<sup>53</sup> Já Sattely e colaboradores reportaram um método para sintetizar um copolímero grafitado de lignina e poli (ácido lático) (lignina-g-PLA), que apresentou maiores temperaturas de transição vítrea que o PLA puro e capacidade de bloquear a radiação ultravioleta.<sup>54</sup>

Assim, em função de sua abundância e estrutura, o desenvolvimento de materiais avançados a partir da lignina apresenta-se como uma alternativa promissora frente ao uso de materiais exclusivamente derivados do petróleo. No entanto, ainda são necessárias abordagens avançadas de extração da lignina da biomassa lignocelulósica e desenvolvimento de métodos e técnicas de processamento da lignina para aplicação em materiais de alto desempenho, visando à sua valorização econômica.<sup>19,27,52</sup>

## 1.4 Nanopartículas de Lignina

Dentre as possíveis aplicações para valorização da lignina, trabalhos recentes têm reportado o preparo de nanopartículas de lignina, que se apresentam como uma nova estratégia de aplicação da macromolécula como bloco estrutural para o preparo de novos materiais funcionais.<sup>32,55-58</sup>

Inicialmente, nanopartículas de lignina foram preparadas na tentativa de melhorar a compatibilidade da macromolécula com polímeros para obter blendas poliméricas, visto que a lignina possui forte associação intramolecular – tanto em função das ligações de hidrogênio como das interações  $\pi$ - $\pi$  de grupos aromáticos – o que dificulta a sua miscibilidade com a matriz polimérica hospedeira, levando à separação de fases.<sup>55,59</sup> Assim sendo, a redução do tamanho da lignina para dimensões nanométricas (nanolignina) possibilitou o preparo de compósitos poliméricos (matriz de PLA) que apresentaram estabilidade térmica aprimorada, aumento da absorção de radiação ultravioleta e elevada capacidade antioxidante em comparação com as matrizes poliméricas puras.<sup>59</sup>

O aprimoramento das propriedades da lignina no regime nanométrico, em comparação com a lignina *bulk*<sup>††</sup>, deve-se ao modo como a nanolignina se organiza estruturalmente quando preparada. Se o meio dispersante for polar, ocorre uma segregação na nanopartícula entre os grupos polares, que são dispostos na superfície, e os grupos apolares, no núcleo. Nesse caso, as nanopartículas que apresentam elevada razão área/volume, possuem maior número de grupos cromóforos na região do ultravioleta e de hidroxilas fenólicas (que são responsáveis pela atividade antioxidante) na superfície.<sup>55</sup>

Frente ao que foi apresentado na seção anterior, espera-se que as nanopartículas de lignina tenham um papel alicerçador na promoção da valorização econômica da biomacromolécula. No entanto, o preparo de nanopartículas de lignina ainda é um tema bastante recente e poucos trabalhos foram publicados pensando na investigação da estabilidade coloidal das nanopartículas com variação do pH e força iônica do meio dispersante.<sup>19,55</sup> Essas caracterizações são importantes para permitir planejamentos e propostas de aplicações das nanopartículas em diferentes matrizes como, por exemplo, cremes dermocosméticos.

---

<sup>††</sup> Neste trabalho, denomina-se como lignina *bulk*, partículas de lignina com tamanho na ordem de  $10^2$  –  $10^3$   $\mu\text{m}$ .

### 1.4.1 Métodos de preparo e estruturas reportadas

O preparo das nanopartículas de lignina depende de sua aplicação final, de sua origem e por qual método ela é extraída. Dentre os métodos reportados, a nanolignina pode ser preparada por meio de metodologias “*bottom-up*”, que consiste no arranjo das macromoléculas formando estruturas nanométricas.<sup>55</sup>

Dentre as metodologias *bottom-up* reportadas, a nanoprecipitação e a auto-organização induzida pela adição de um não-solvente foram as mais relatadas na literatura. Nesta última, o não-solvente induz o processo de auto-organização das moléculas de lignina levando à formação de nanopartículas de simetria esférica. Como exemplo, tem-se o trabalho de Velev e colaboradores, que prepararam nanopartículas de lignina organossolve ao dissolvê-la em acetona e adicionar água como não-solvente, induzindo a formação de nanopartículas.<sup>55,56</sup>

Além dos processos químicos, poucos trabalhos reportaram, também, a obtenção de nano e micropartículas a partir do processamento mecânico da lignina em pó dispersada em água – seguindo o princípio “*top-down*” para a obtenção de nanomateriais. As nanopartículas são obtidas, nesse caso, por meio da aplicação de elevadas taxas de cisalhamento, resultando no rompimento da partícula *bulk* de lignina e formação de estruturas nanométricas. Como consequência, as nanopartículas preparadas apresentaram formatos irregulares. Apesar disso, os métodos mecânicos são bastantes interessantes por dispensarem o uso de solventes orgânicos.<sup>60-62</sup>

Nanopartículas de lignina também podem ser obtidas ao injetar uma solução de lignina em acetona em uma câmara com fluxo contínuo de CO<sub>2</sub> supercrítico, que atua como não-solvente e leva à formação das nanopartículas.<sup>63</sup> Ademais, também é possível combinar métodos químicos e mecânicos. Em um trabalho recente, Sun e colaboradores reportaram uma metodologia que associou a adição de água como não-solvente e a sonicação para homogeneização da suspensão e obtenção de nanopartículas esféricas.<sup>64</sup>

Além das nanopartículas esféricas, também foi reportado na literatura a obtenção de nanotubos e fios nanométricos de lignina. Para preparar essas

nanoestruturas, foram utilizadas membranas de alumina como template para a polimerização da lignina nos macroporos (~200 nm) da membrana. Para liberar o material nanoestruturado, o template de alumina foi dissolvido em ácido fosfórico contendo o surfactante Triton X-100.<sup>65</sup>

Para este trabalho de mestrado, foi feito um levantamento de todos artigos até o presente, que reportaram metodologias para o preparo de nanopartículas. O levantamento bibliográfico é apresentado na *Tabela 1*. Dentre os métodos reportados, um dos mais recorrentes é o preparo das nanopartículas de lignina com adição de não-solvente, que induz o processo de auto-organização dos fragmentos da macromolécula em estruturas esféricas.

**Tabela 1.** Levantamento bibliográfico dos métodos reportados na literatura para o preparo de nanopartículas e nanoestruturas de lignina.

	Métodos	Morfologia, diâmetro médio e potencial zeta	Aplicação	Referências
Químicos ( <i>bottom – up</i> )	Nanoprecipitação com adição de não-solventes e ácidos	Nanopartículas esféricas (30 – 700 nm) (> -28 mV)	Agente antimicrobiano, nanocompósitos, protetor UV, carreador de fármacos	66–73
	Auto-organização induzida pela adição de não-solventes (troca de solvente)	Nanopartículas esféricas e/ou esferas ocas (130 – 600 nm) (> -30 mV)	Aditivo em termoplásticos, emulsão tipo <i>pickering</i> , agente antimicrobiano	57,68,74–79
	Evaporação de solventes (CO <sub>2</sub> supercrítico)	Nanopartículas de formato irregular* (110 – 170 nm)	Agente antioxidante	63,80
	Polimerização	Nanotubo (200 nm)	Transporte de genes em células humanas	65

Tabela 1 – CONTINUAÇÃO.

Métodos	Morfologia, diâmetro médio e potencial zeta	Aplicação	Referências	
<b>Mecânicos (top – down)</b>	Cisalhamento	Nanopartículas de formato irregular (25 – 1000 nm)*	Blendas de nanolignina/PVA	62,81
	Sonicação	Nanopartículas de formato irregular (10 – 500 nm)*	Não foram aplicadas	60,61,82,83
	Homogeneização por pressão	Nanopartículas esféricas (10 – 500 nm) (> -25 mV)	Não foram aplicadas	84
<b>Químico e mecânico</b>	Troca de solvente acompanhada por sonicação	Nanopartículas esféricas (100 – 800 nm)	Protetor UVA-UVB	64

\* Neste caso, o tamanho refere-se à maior dimensão da nanopartícula

#### 1.4.2 Potenciais aplicações

A despeito das nanopartículas de lignina terem sido apresentadas à comunidade científica como uma possibilidade de aplicação de alto valor da lignina, esse tema ainda está em sua gênese no que concerne ao depósito de patentes. Há somente um pedido de patente a respeito da obtenção e aplicação das nanopartículas de lignina – o registro encontrado na base de dados da USPTO foi protocolado em 2017. Nele, os autores reivindicaram o preparo das nanopartículas por meio da solubilização da lignina em um solvente orgânico e adição de água contendo um surfactante. Em seguida a lignina foi reticulada para obter as nanopartículas contendo um pesticida hidrofóbico, que pode ser carregado pelas nanopartículas e liberado de maneira controlada nas plantas.<sup>85</sup>

Lu e colaboradores mostraram que as nanopartículas de lignina são potencialmente aplicáveis em matrizes poliméricas para a produção de nanocompósitos poliméricos multifuncionais.<sup>77</sup> Por exemplo, filmes de poli (álcool vinílico) (PVA) contendo nanopartículas de lignina apresentaram elevada absorção de radiação UV e elevada atividade antioxidante. Os autores ainda apontaram que uma modificação hidrofóbica superficial das nanopartículas permitiria a compatibilização com matrizes poliméricas apolares, propiciando, portanto, um espectro de aplicações mais abrangente. Esses nanocompósitos podem ser aplicados, por exemplo, na produção de embalagens e filmes com alto desempenho na blindagem da radiação UV.

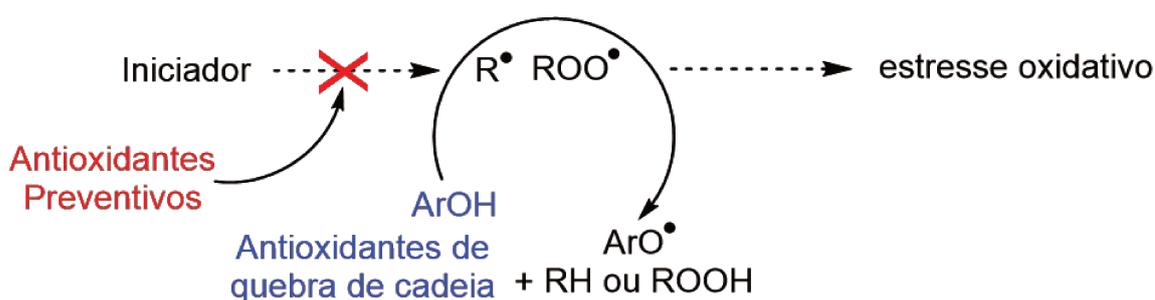
Outra proposta de aplicação das nanopartículas seria em matrizes e substratos com propriedade bactericida, como discutido por Velev e colaboradores.<sup>66</sup> Neste trabalho, os autores apresentaram uma forma de incorporar íons  $\text{Ag}^+$  na estrutura das nanopartículas de lignina que são responsáveis pela liberação controlada dos íons na vizinhança. A liberação de pequena quantidade de íons foi suficiente para suprimir bactérias Gram-negativo e Gram-positivo e, dessa forma, as nanopartículas de lignina podem ser uma alternativa biodegradável e verde para as tradicionais nanopartículas de prata.

E, por fim, outra potencial aplicação das nanopartículas de lignina seria em produtos com propriedade de depuração radicalar. A lignina tem sido apresentada no meio acadêmico como uma macromolécula de potencial aplicação na indústria farmacêutica em função de sua excelente atividade antioxidante.<sup>86</sup> Não obstante, a lignina tem solubilidade bastante limitada e, portanto, uma solução para este entrave é o preparo de nanopartículas de lignina. Estas podem ser dispersas facilmente em diferentes matrizes como cremes e suspensões aquosas, aplicadas em dermocosméticos com propriedades antioxidantes.

## 1.5 Antioxidantes inspirados na natureza

### 1.5.1 Sobre os antioxidantes

Antioxidantes são compostos aplicados em baixas concentrações ( $0,001 - 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e capazes de retardar o processo de formação de radicais livres no organismo. Eles podem atuar diretamente na etapa de iniciação de formação de espécies radicalares ou na depuração dos radicais formados inibindo a reação de propagação.<sup>87</sup> Assim, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: os preventivos e os de quebra de cadeia reacional (do inglês, *chain-breaking antioxidants*), como apresentado na *Figura 8*.



**Figura 8.** Esquema simplificado da ação dos antioxidantes preventivos e de quebra de cadeia para inibir a formação de radicais livres no organismo. Adaptado de Valgimigli e colaboradores.<sup>87</sup>

Os antioxidantes preventivos podem ser, por exemplo, enzimas como a catalase ou agentes quelantes como o ácido fólico ( $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ). Em geral, os antioxidantes preventivos atuam bloqueando reações de oxirredução. Os antioxidantes de quebra de cadeia reacional, por sua vez, reagem com espécies radicalares de maneira mais rápida do que as biomoléculas e substratos do organismo e, desse modo, eles impedem a propagação das reações de formação de radicais livres.<sup>87,88</sup>

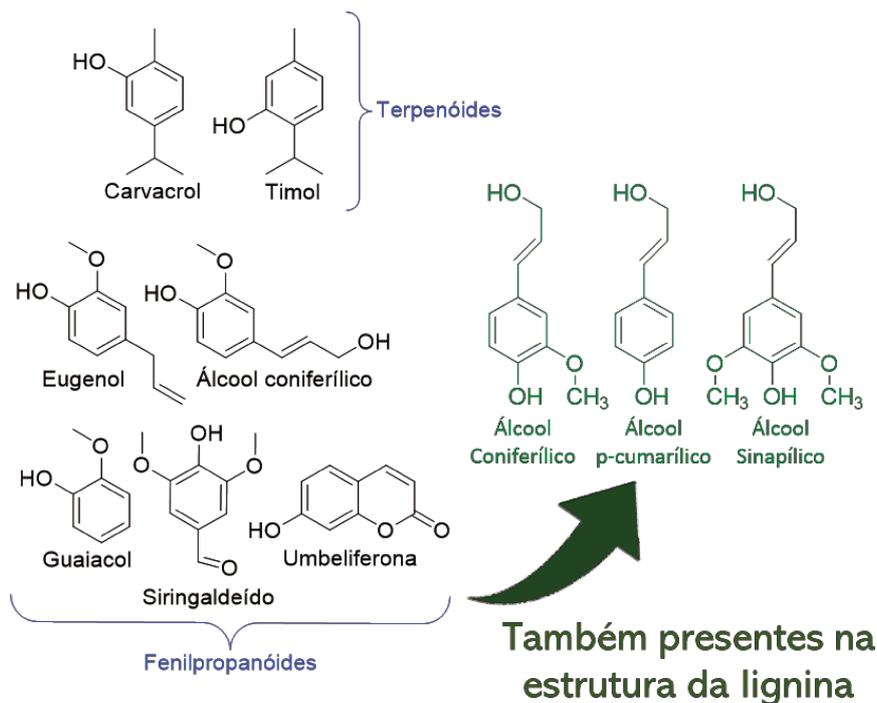
Como os antioxidantes preventivos são praticamente ineficientes após a formação de espécies radicalares no organismo, os antioxidantes de quebra de cadeia são, portanto, preferencialmente utilizados em formulações de fármacos e produtos dermocosméticos. Em geral, os antioxidantes de quebra de cadeia são compostos fenólicos que reagem com espécies radicalares transferindo um próton e um elétron a elas

– o que resulta na formação de radicais fenoxila, que são estabilizados pela ressonância do anel aromático.<sup>87,89,90</sup>

Tradicionalmente, os depuradores de radicais aplicados na indústria de alimentos e de dermocosméticos são principalmente: butilhidroxitolueno (BHT), 2-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e tri-hidroxi-butilfenona (THBP). No entanto, estudos toxicológicos têm demonstrado que esses antioxidantes sintéticos podem apresentar algum efeito tóxico no organismo humano. Sabe-se, por exemplo, que o BHT é nocivo à saúde a longo prazo, apresentando efeitos de promoção de tumores e inibindo a imunidade humoral; no entanto, ele ainda é liberado para o uso, respeitando o valor máximo de 0,5% em massa nas formulações.<sup>88,91,92</sup>

Em vista do problema relacionado ao uso de antioxidantes sintéticos, há um interesse crescente na investigação e uso de antioxidantes naturais em alimentos e cosméticos.<sup>87</sup> Por exemplo, os terpenóides e fenilpropanóides de óleos essenciais (*Figura 9*), que são misturas líquidas de moléculas voláteis extraídas das plantas, têm recebido bastante atenção, tanto no meio acadêmico como nas indústrias. No entanto, o processo de separação das moléculas de óleos essenciais em escala industrial pode ser bastante custoso. Além disso, a quantidade de óleos essenciais nas plantas é tipicamente inferior a 1% e, raramente, pode atingir valores de até 15%.<sup>93</sup>

A lignina, por sua vez, apresenta-se como uma potencial alternativa de aplicação como antioxidante em dermocosméticos, visto que ela é constituída de fenilpropanóides e tem elevada concentração de grupos fenólicos (*Figura 9*). Ademais, ela é biocompatível e pode ser extraída em grandes quantidades. Contudo, a lignina (Kraft, Soda e Organossolve) só é solúvel em alguns solventes orgânicos e em meio alcalino, o que praticamente impede o seu uso em cosméticos.<sup>86</sup> Em vista disso, propõe-se o uso de nanopartículas de lignina, que podem ser facilmente dispersas e aplicadas em diversas matrizes, como na fase aquosa de emulsões de dermocosméticos.



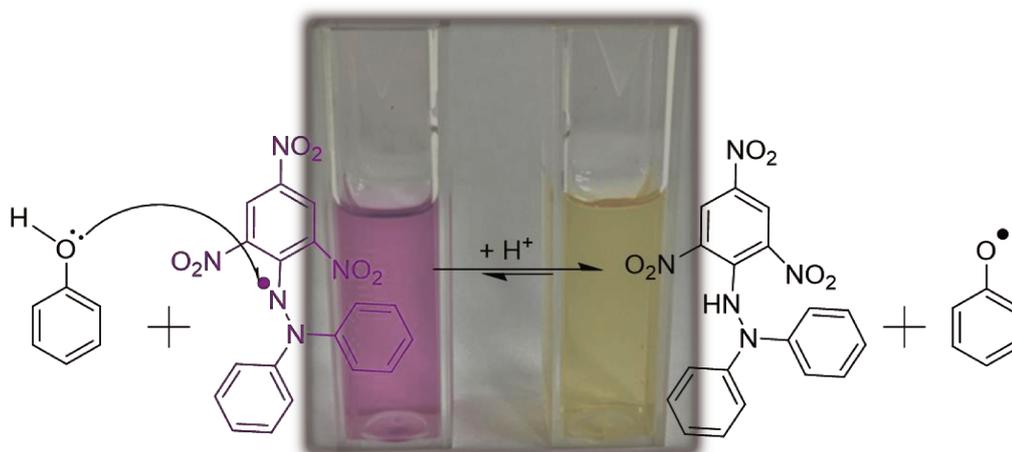
**Figura 9.** Compostos fenólicos característicos encontrados em óleos essenciais que podem ser aplicados em produtos com atividade antioxidante. Os fenilpropanóides que compõem a lignina também podem ser substitutos dos antioxidantes sintéticos.<sup>87</sup>

### 1.5.2 Sobre os métodos de determinação de atividade antioxidante

O interesse em avaliar a atividade antioxidante das moléculas vem da necessidade de quantificar o potencial antioxidante dos compostos em baixas concentrações. Há um amplo acervo de métodos reportados na literatura para mensurar a capacidade antioxidante das substâncias, sendo que as metodologias partem do mesmo princípio, em que se monitora a eliminação de uma espécie radicalar em função do tempo por técnicas espectrofotométricas (UV-vis) ou por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).<sup>91</sup>

Dentre os métodos reportados (DPPH<sup>•</sup> – radical- $\pi$  2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS<sup>•+</sup> – ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico; ORAC – do inglês, *oxygen radical absorbance capacity*; FRAP – do inglês, *ferric-reducing ability of plasma*; TRAP – do inglês, *total radical trapping antioxidant parameter* e CUPRAC – do inglês, *cupric ions reducing antioxidant power*), o mais utilizado é o método colorimétrico baseado na eliminação do radical- $\pi$  DPPH<sup>•</sup>, por ser considerado um método altamente sensível,

preciso, simples e econômico.<sup>88,91</sup> Vários depuradores de radicais reagem com o DPPH<sup>•</sup> transferindo a ele um elétron e um próton, como apresentado na *Figura 10*.



**Figura 10.** Representação esquemática do mecanismo de depuração do radical DPPH<sup>•</sup> por compostos fenólicos. No método, acompanha-se a diminuição da banda de absorção do DPPH<sup>•</sup> (515 nm, cor violeta) com o tempo.

O método DPPH<sup>•</sup> foi inicialmente desenvolvido por Blois em 1958, e adaptado posteriormente por Brand-Williams, Cuvelier e Berset em 1995.<sup>94</sup> Até hoje, utiliza-se o método de Brand-Williams, em que os resultados são apresentados em termos do valor de EC<sub>50</sub> (concentração eficaz) ou do índice de eliminação radicalar (RSI, do inglês *Radical Scavenging Index*). O EC<sub>50</sub> é definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH<sup>•</sup> em 50%, enquanto o RSI é definido como o inverso do EC<sub>50</sub>. Sendo assim, quanto menor a concentração de antioxidante necessária para eliminar 50% do radical, maior será o seu valor de RSI.

## 1.6 Um protetor solar inspirado na natureza

Nas últimas décadas a incidência de câncer de pele (melanoma e não melanoma) tem aumentado progressivamente, sendo que a estimativa do INCA (Instituto Nacional de Câncer) de novos casos no Brasil foi de, aproximadamente, 172 mil em 2018 considerando os dois tipos.<sup>95</sup> Já os dados da WHO (do inglês, *World Health Organization*) apontam que 3 milhões de casos são reportados anualmente no mundo todo.<sup>96</sup> O principal fator de risco para o desenvolvimento dos carcinomas e melanomas é a exposição à luz do sol, tanto as de baixas frequências UVA (320 – 380 nm) e UVB (280 – 320 nm), como

também a radiação visível e do infravermelho próximo (750 – 1400 nm), como apontam estudos recentes.<sup>95–97</sup>

Os protetores solares, introduzidos no mercado em 1930, fornecem proteção à pele contra os efeitos da radiação solar. Para uma substância ser classificada como fotoprotetora, ela deve fornecer um fator de proteção solar (FPS) mínimo de 6 para a radiação UVB e um terço do valor para a radiação UVA. Os filtros solares podem ser classificados como físicos (óxidos) e químicos (moléculas orgânicas), sendo que os protetores físicos, como partículas de óxido de titânio  $\text{TiO}_2$  e óxido de zinco  $\text{ZnO}_2$ , atuam refletindo e espalhando a radiação incidente; já os protetores químicos são moléculas orgânicas que possuem grupos cromóforos absorvedores da radiação UV.<sup>98,99</sup>

Os filtros orgânicos são divididos em derivados de ácido para-aminobenzóicos (PABA), de cânfora, de benzofenonas, de salicilatos e de cinamato. A ação protetora desses compostos já é bem documentada. No entanto, estudos recentes apontam que o uso prolongado dos filtros sintéticos pode trazer efeitos colaterais à pele e os protetores solares comercializados também são danosos ao meio ambiente.<sup>100</sup> Neste estudo, moléculas sintéticas aplicadas em dermocosméticos fotoprotetores foram apontadas como tendo um impacto negativo na biota marinha, promovendo o branqueamento de corais e comprometendo a biodiversidade aquática.<sup>98,100</sup>

Donavoro e colaboradores mostraram que mesmo baixas quantidades de filtros protetores na água do mar ( $10 \mu\text{L L}^{-1}$ ) resultam na liberação do muco dos corais, promovendo infecções virais. Eles ainda apresentaram a estimativa de que 10% dos recifes no mundo, que são regiões de recreação, estão potencialmente ameaçados pelo branqueamento dos corais, induzida pelo uso de protetores solares que são lixiviados para a água. Em vista dos problemas relacionados ao uso de fotoprotetores sintéticos, buscase por compostos naturais e que não sejam tóxicos à biota marinha e ao uso humano.<sup>100</sup>

A lignina, por sua vez, tem sido relatada recentemente como uma potencial alternativa de aplicação como filtro solar em dermocosméticos. Em um trabalho recente, publicado com destaque na revista *Chemistry World* da RSC, Qian e colaboradores

mostraram que a lignina é responsável por aumentar até 5 vezes o fator de proteção solar (FPS) de filtros solares.<sup>101</sup>

Ademais, a atividade antioxidante da lignina é um fator importante, visto que antioxidantes são adicionados aos filtros solares para fornecer proteção contra radicais livres e espécies oxidantes que são formadas com a incidência da radiação UV. A adição desses compostos antioxidantes tem, assim, o papel de aumentar o tempo útil de uso dos protetores. Por fim, Ugartondo e colaboradores testaram a citotoxicidade de quatro tipos de ligninas comerciais e apontaram que seu uso é assegurado, sendo que elas podem, inclusive, ser incorporadas em células.<sup>102</sup>

## 1.7 Nanotecnologia aplicada em cosméticos

A aplicação de nanomateriais em produtos cosméticos foi proposta, inicialmente, pela marca Lancôme da L'Oréal em 1995, quando a empresa lançou no mercado um creme facial com nanocápsulas carreadoras de vitamina E.<sup>103</sup> Após o pioneirismo do grupo L'Oréal, outras companhias de cosméticos no mundo começaram a investir em nanocosméticos.<sup>103</sup> No Brasil, a empresa O Boticário foi a primeira a lançar um produto no mercado de nanocosméticos: o creme Nanoserum contendo nanocarreadores de vitamina A, C e K. Atualmente, nanopartículas estão presentes em diversos produtos cosméticos como xampus, condicionadores, cremes dentais, desodorantes, protetores solares e outros.<sup>103,104</sup>

Nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  também são aplicadas em filtros solares para proteção contra os efeitos danosos da radiação UV. No entanto, há uma preocupação recente quanto ao uso dessas nanopartículas em protetores solares, pois foi comprovado que nanopartículas de óxidos metálicos promovem a formação de espécies reativas de oxigênio quando são expostas à radiação UV. Ademais, um ponto imprescindível quando se trata do *design* de nanomateriais é o impacto ambiental a longo prazo do uso de nanopartículas inorgânicas sintéticas em bens de consumo. Essas, normalmente, são persistentes em estações de tratamento de águas residuais e podem levar a impactos ambientais de longo prazo.<sup>105,106</sup>

Alternativamente, é possível mitigar esse problema com a introdução de nanopartículas biodegradáveis no projeto inicial de nanomateriais destinados às aplicações de produtos farmacêuticos e dermocosméticos.<sup>105</sup> Assim, a lignina surge como um precursor interessante para o desenvolvimento de nanopartículas ambientalmente corretas para aplicação em cosméticos – já que ela é de origem natural, é biocompatível e biodegradável. No entanto, estudos para a obtenção e caracterização de nanopartículas de lignina são bastante recentes, com apenas alguns poucos relatos na literatura até o momento, como foi apontado no item 1.4.

Neste cenário, este projeto de mestrado apresentou uma metodologia para o isolamento de lignina do capim-elefante e a caracterização de sua estrutura após o processo de fracionamento. Adicionalmente, nanopartículas de lignina e de acetato de lignina foram preparadas pelo método de adição de não-solvente e por cisalhamento mecânico. A estabilidade físico-química das suspensões e a atividade antioxidante das nanopartículas e soluções de lignina também foram investigadas, bem como os fatores de proteção solar de cremes comerciais contendo as nanopartículas preparadas. Por fim, este trabalho traz o estudo da aplicabilidade da lignina em produtos de valor agregado, como os dermocosméticos com propriedades antioxidante e fotoprotetora.

## 2. Objetivos

Este trabalho teve como finalidade a extração de lignina do capim elefante e seu uso para preparar nanopartículas de lignina. Outro objetivo foi investigar a morfologia e a estabilidade das nanopartículas e estudar suas atividades antioxidantes em comparação com as soluções de lignina e de acetato de lignina. Com isso, os objetivos específicos foram:

- I. Extrair e caracterizar a lignina do capim elefante;
- II. Preparar e caracterizar nanopartículas de lignina;
- III. Estudar a capacidade antioxidante das nanopartículas preparadas em comparação com as soluções de lignina;
- IV. Avaliar a possibilidade de aplicação das nanopartículas de lignina em cremes dermocosméticos com ação fotoprotetora e antioxidante.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1 Materiais

Folhas de capim elefante, *Pennisetum purpureum*, cultivar Guaçu, foram coletadas um ano após o plantio no Instituto de Zootecnia (Nova Odessa, SP). As folhas do capim foram cortadas até obter comprimentos médios entre 10 e 15 cm. Em seguida, as folhas foram secas em uma estufa com circulação de ar (Tecnal TE – 394/3 MP) a 60°C por 12 h. Posteriormente, o material seco foi moído em um moinho de facas (Solab, SL – 31) com peneira/malha de 2 mm. As folhas secas e moídas com teor de umidade de aproximadamente 5,0% foram armazenadas em caixas plásticas. Os reagentes usados no pré-tratamento ácido-base do capim elefante foram H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%, LSChemicals) e NaOH (P.A., Synth). Para preparar as soluções de lignina, utilizou-se acetona (P.A, Synth) e 1,4-dioxano (P.A., Synth), enquanto nas titulações, utilizou-se HCl (38%, LSChemicals). Para o estudo da atividade antioxidante da lignina, utilizou-se o reagente 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH, SigmaAldrich®) e metanol (P.A., Synth). Para preparar os protetores com nanopartículas de lignina, utilizou-se uma base neutra de creme com emulsionantes não-iônicos (DERMABASE CNA, Dermavita Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos LTDA. Composição indicada no rótulo: *Aqua; Cetearyl Alcohol (and) Steareth-10 (and) Steareth-20; Cetearyl alcohol; Propylene Glycol; Mineral Oil; Isopropyl Myristate; Ceteareth-20; Imidazolidinyl urea; Phenoxyethanol (and) Methylisothiazolinone; Disodium EDTA*) e para comparar o fator de proteção dos cremes preparados, utilizaram-se protetores comerciais rotulados com FPS 30 (A = Vichy Laboratories®; B = La Roche-Posay Laboratoire Dermatologique®; C = DERMABASE FPS 30, Dermavita Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos LTDA.).

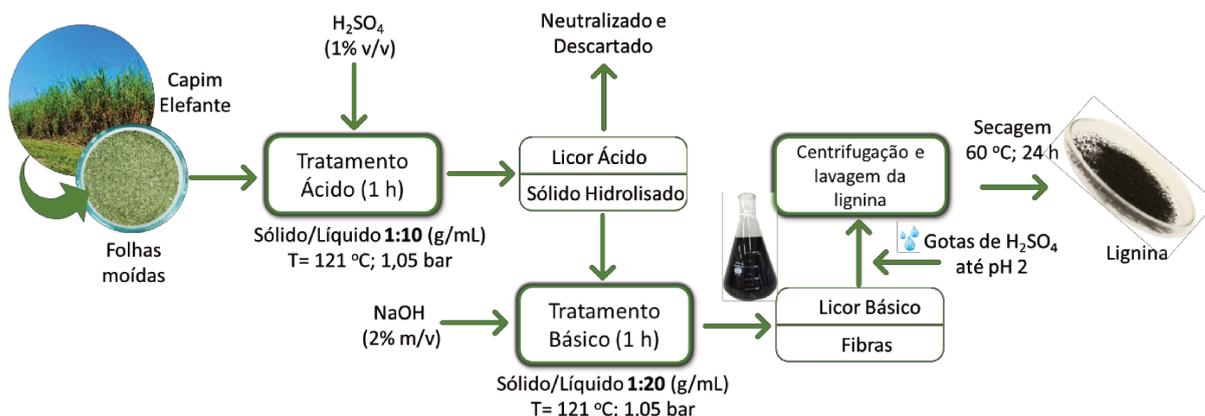
## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Pré-tratamento da Biomassa: Fracionamento e Recuperação da Lignina

Para extrair a lignina das folhas, utilizou-se um tratamento sequencial com ácido e base diluídos. O pré-tratamento ácido-base do capim elefante, sumarizado na *Figura 11*, foi baseado em um trabalho anterior deste grupo de pesquisa.<sup>22,107</sup> Para realizá-lo, na etapa ácida, utilizou-se uma proporção 1:10 (g/mL) da biomassa para solução de  $H_2SO_4$  (1% v/v em água). A hidrólise do material lignocelulósico foi feita em uma autoclave a 121 °C e 1,05 bar durante 1 h. Em seguida, o material sólido hidrolisado foi separado do licor ácido por filtração e lavado até pH neutro.

Para realizar o fracionamento da lignina, o material sólido obtido após a hidrólise ácida foi submetido, sequencialmente, a um tratamento básico. Para tal, utilizou-se uma proporção 1:20 (g/mL) do sólido hidrolisado para solução de NaOH (2% m/v em água) e o tratamento foi realizado em uma autoclave nas mesmas condições de pressão, temperatura e tempo do tratamento ácido. Por fim, o material sólido foi separado do licor básico, que contém a lignina, por filtração. A quantidade de água utilizada para lavar o material sólido foi de 4 vezes o volume de solução básica utilizada no tratamento. Este número foi estabelecido após verificar que, com volumes maiores de água de lavagem, não era possível recuperar mais lignina.

A recuperação da lignina sólida foi baseada no trabalho de Nitsos e colaboradores, que consiste na acidificação do licor básico via adição de gotas de ácido sulfúrico concentrado até  $pH \approx 2$ .<sup>44</sup> O licor acidificado foi centrifugado a 5000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi descartado, um ciclo que foi repetido até a obtenção de um sobrenadante limpo. Por fim, a lignina sólida foi separada do sobrenadante e seca a 60 °C durante 24 h, para posterior caracterização e preparo das nanopartículas de lignina pelo método da adição de não-solvente. Já para o preparo das nanopartículas pelo cisalhamento mecânico, manteve-se a lignina em suspensão no sobrenadante limpo.



**Figura 11.** Fluxograma da metodologia adotada para o fracionamento e recuperação da lignina do capim elefante.

### 3.2.2 Acetilação da Lignina

Lignina seca (1 g) foi dissolvida em 6 mL de piridina antes da adição de 6 mL de anidrido acético. O sistema reacional foi isolado da luz ambiente e mantido sob agitação constante por 72 h, como já descrito no trabalho de Pan e colaboradores.<sup>90</sup> Posteriormente, a solução contendo o produto acetilado foi adicionada gota-a-gota a 240 mL de água deionizada (4 °C) contendo 2 mL de ácido clorídrico, sob agitação constante. O acetato de lignina, precipitado na etapa anterior, foi filtrado e lavado com 500 mL de água deionizada. Finalmente, secou-se o produto acetilado em um vidro de relógio sob  $P_2O_5$  e vácuo por 24 h.

### 3.2.3 Obtenção das Nanopartículas de Lignina

#### ***Auto-organização Induzida pela Adição de Não-Solvente (Água)***

Nanopartículas de lignina e de acetato de lignina foram preparadas pela adição de não-solvente seguindo uma metodologia adaptada de Velez e colaboradores,<sup>66</sup> que parte do princípio “*bottom-up*” para obtenção de nanomateriais. Inicialmente, preparou-se uma solução de lignina em acetona ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), que foi sonicada durante 15 min. Em seguida, a solução foi filtrada através de um filtro de seringa de Nylon com poro de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  (Analítica®) para reter possíveis partículas de lignina que não foram solubilizadas. Finalmente, para sintetizar as nanopartículas de lignina, adicionou-se, rapidamente, água

Tipo I (MilliQ) na proporção de solução de lignina para água de 1:10 (v/v). O sistema foi mantido sob agitação durante 10 min e, então, a acetona residual foi removida em um rotaevaporador a 40 °C, 400 mmHg de vácuo por 4 h e as nanopartículas foram armazenadas em frasco âmbar.

### **Cisalhamento Mecânico**

As nanopartículas de lignina foram preparadas por cisalhamento seguindo uma metodologia adaptada de Ragauskas e colaboradores.<sup>62</sup> Inicialmente, 100 mL da suspensão de lignina, obtida após os ciclos de centrifugação (item 3.2.1), foi tamponada com adição de 1 mL de tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup>). Em seguida, a suspensão foi submetida a um processo de intensa homogeneização durante 4 h utilizando um homogeneizador rotor-estator (IKA Ultra-Turrax T25) a 15000 rpm. O mesmo preparo foi feito sem tamponar a suspensão no início, para as caracterizações que envolvem a adição de ácidos e bases, como na titulação condutimétrica e o estudo da estabilidade das nanopartículas frente à variação do pH do meio dispersante.

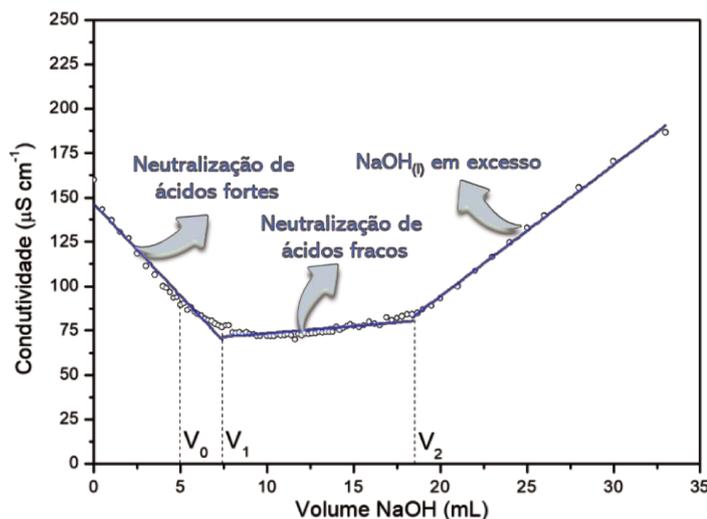
### 3.2.4 Titulação Condutimétrica

Para quantificar as hidroxilas superficiais presentes em grupos ácidos na superfície da lignina *bulk* e das nanopartículas de lignina, adicionaram-se 5 mL de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> à suspensão de micropartículas e de nanopartículas de lignina, respectivamente. Em seguida, sob agitação constante, quantidades do titulante NaOH 0,01 mol L<sup>-1</sup> foram constantemente adicionadas ao titulado.<sup>108</sup> Acompanhou-se a variação da condutividade do meio utilizando um condutímetro AJX-515 da AJ Micronal®. As medidas foram feitas em triplicata e a concentração de grupos dissociáveis na superfície das partículas foi calculado conforme as Equações 1 e 2 para determinação de ácido forte e fraco, respectivamente.

$$\text{Ácido Forte (mmol g}^{-1}\text{)} = \frac{C_{\text{NaOH}} \times (V_1 - V_0)}{m} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{Ácido Fraco (mmol g}^{-1}\text{)} = \frac{C_{\text{NaOH}} \times (V_2 - V_1)}{m} \quad \text{Eq. 2}$$

em que  $C_{NaOH}$  é a concentração do titulante;  $m$  é a massa de lignina em suspensão;  $V_1$  é o volume de base necessário para neutralizar os ácidos fortes da superfície;  $V_2$  é o volume de base necessário para neutralizar os ácidos fracos e  $V_0$  é o volume de HCl adicionado, como apresentado na *Figura 12*.



**Figura 12.** Representação de uma curva característica de titulação condutimétrica obtida experimentalmente para uma suspensão de nanopartículas de lignina. No início, ocorre neutralização de ácidos fortes e, no momento da neutralização de grupos ácidos fracos, a condutividade do meio mantém-se aproximadamente constante.

### 3.2.5 Avaliação da Atividade Antioxidante

As atividades antioxidantes da lignina em solução e das nanopartículas de lignina foram determinadas baseando-se nas suas capacidades de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH<sup>\*</sup>), seguindo o método colorimétrico adaptado de Dizhbite e colaboradores.<sup>109</sup> Para o estudo da atividade antioxidante da lignina em solução, 640 µL das soluções de lignina (0,001 – 0,5 mg mL<sup>-1</sup>) em dioxano 90% (v/v em água) foram separadamente misturados com 2360 µL de DPPH<sup>\*</sup> 65 µmol L<sup>-1</sup> em metanol. Para cada concentração de lignina, acompanhou-se a reação de eliminação do radical, monitorando-se a absorção da banda do DPPH<sup>\*</sup> em 515 nm no início ( $Absorção_{t=0min}$ ) e após 16 e 30 min ( $Absorção_{t=t'}$ ) de reação, utilizando um espectrofotômetro da Agilent Technologies® modelo 8453. As porcentagens de inibição radicalar (PI%) foram calculadas para os tempos fixos conforme a Equação 3.

$$PI (\%) = \frac{Absorção_{t=0min} - Absorção_{t=t'}}{Absorção_{t=0min}} \times 100 \quad Eq. 3$$

Os valores de PI foram representados graficamente em função das concentrações de lignina adicionadas e, a partir desse gráfico, foi possível determinar a concentração de lignina necessária para reduzir a concentração do DPPH\* em 50% do valor inicial, que é denominado concentração eficaz ( $EC_{50}$ ). A capacidade antioxidante da lignina em solução também foi apresentada em termos do índice de eliminação radicalar, RSI (do inglês, *Radical Scavenging Index*) que é definido como o inverso do  $EC_{50}$ . Sendo assim, quanto menor a concentração de antioxidante necessária para eliminar 50% do radical, maior será o seu valor de RSI. Para avaliar a atividade antioxidante das nanopartículas de lignina, esse procedimento foi reproduzido substituindo as soluções de lignina pelas suspensões de nanopartículas em água (0,001 – 0,5 mg mL<sup>-1</sup>). Tanto para a lignina em solução, quanto para as nanopartículas; o ensaio foi realizado em duplicata sob temperatura constante de 20 °C.

### 3.2.6 Incorporação das Nanopartículas de Lignina em Base de Creme Pura e Avaliação do Fator de Proteção Solar *in vitro*.

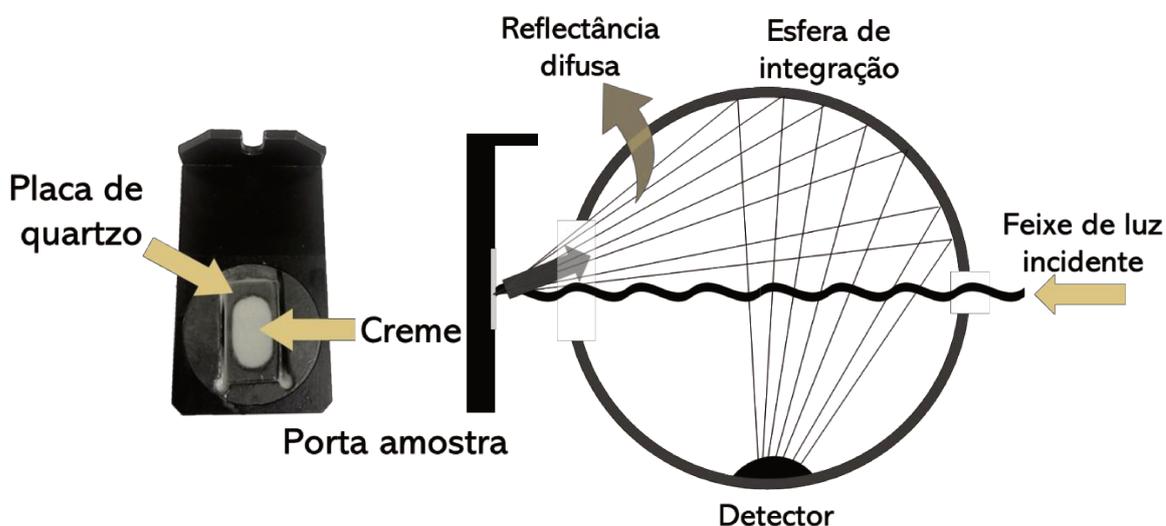
As suspensões de nanopartículas preparadas pelo método da adição de não-solvente e pelo cisalhamento mecânico (todas com concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>) foram incorporadas em uma base neutra de creme não-iônico utilizada em formulações de dermocosméticos de farmácias de manipulação (DERMABASE creme CNA). As loções foram preparadas com adições crescentes de nanopartículas de lignina (em %, m/m): 0,25 %; 0,50 %; 1,0 %; 3,0 %; 5,0 %; e 10,0 %. Por exemplo, para a loção contendo 10,0 % de nanopartícula de lignina, pesou-se 0,90 g de creme e adicionou-se 10 mL da suspensão de nanopartícula (0,1 g). As loções foram preparadas em tubos de 15 mL e homogeneizadas em um agitador de tubos (Phoenix AP 56) até garantia visual de completa homogeneização.

Posteriormente, os cremes foram transferidos para uma cela de quartzo com fundo preto, como apresentado na *Figura 13*, e mediu-se a transmitância dos cremes na região do UV-vis em um espectrômetro de refletância difusa com esfera de integração (Shimadzu UV – 2450). Os fatores de proteção solar (FPS) foram determinados em

triplicatas pelo método *in vitro* a partir da Equação 4, desenvolvida por Mansur e colaboradores<sup>110</sup>:

$$FPS_{in\ vitro} = CF \times \sum_{\lambda=290}^{\lambda=320} E_{\lambda} \times S_{\lambda} \times Abs_{\lambda} \quad Eq. 4$$

Em que, CF (=10) é um fator de correção empírico do método *in vitro*;  $E_{\lambda}$  é o parâmetro da efetividade espectral eritematosa;  $S_{\lambda}$  é a irradiância solar espectral e  $Abs_{\lambda}$  é a absorção da radiação UV para um determinado comprimento de onda (numericamente igual a  $2 - \log_{10}\{\text{Transmitância}\}$ ). Os valores da multiplicação  $E_{\lambda} \times S_{\lambda}$  encontram-se tabelados no trabalho de Marlowe e colaboradores<sup>111</sup>.



**Figura 13.** Imagem do porta amostra contendo o filme (0,5 mm de espessura) de creme posicionado frontalmente ao feixe de luz incidente. O feixe, ao incidir na amostra, é refletido em vários ângulos (reflectância difusa) e os feixes refletidos chegam ao detector após serem novamente refletidos no interior da esfera de integração.

### 3.3 Caracterizações

#### 3.3.1 Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido (SSNMR)

O NMR em estado sólido foi utilizado para investigar a variação da composição química do capim durante o pré-tratamento ácido-base e após a recuperação da lignina sólida. Assim, os espectros foram obtidos em um espectrômetro de sólidos de 400 MHz

da Bruker®. Todos os experimentos foram realizados utilizando a combinação das técnicas de desacoplamento heteronuclear, MAS (rotação da amostra em torno do ângulo mágico, do inglês, *Magic Angle Spinning*) e polarização cruzada (CP, do inglês, *Cross Polarization*); visando à obtenção de espectros com uma boa razão sinal/ruído. Os espectros foram obtidos utilizando frequência de rotação de 13 kHz e tempo de pulso  $\pi/2$  de 5  $\mu\text{s}$  tanto para o  $^{13}\text{C}$  quanto para  $^1\text{H}$ . Para obter cada espectro, aplicaram-se pulsos com intervalos de 2 s, tempo de contato de 4 ms e foram feitas 5000 varreduras a 25 °C.

### 3.3.2 Determinação da Composição de Lignina nos Sólidos Obtidos após Cada Etapa do Pré-tratamento e Pureza da Lignina.

Os teores de lignina foram determinados nos substratos sólidos utilizando o método “lignina solúvel em brometo de acetila” (LSBA) como reportado na literatura.<sup>112</sup> Para tanto, 4 mg de resíduo sólido foram transferidos para um tubo de 2 mL com tampa, ao qual foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de solução de brometo de acetila preparada recentemente (25:75 v/v de brometo de acetila para ácido acético glacial). Após 3 h de reação sob agitação constante, o licor de reação foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL, e adicionou-se 1 mL de NaOH (2 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e 175  $\mu\text{L}$  de hidroxilamina-HCl (0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ ), e a solução foi homogeneizada em um agitador de tubos. Finalmente, o balão volumétrico foi preenchido com ácido acético glacial até a marca de 5 mL e agitado no agitador de tubos por 1 min. O conteúdo de lignina foi determinado em um espectrofotômetro da Agilent Technologies® modelo 8453 usando uma curva de calibração com o coeficiente de absorvidade ( $\epsilon$ ) de 17,75  $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda=280 \text{ nm}$ .

### 3.3.3 NMR 2D de Correlação a Uma Ligação (HSQC)

O diagrama de correlação 2D foi utilizado para investigar as subunidades estruturais da lignina. Para obter os espectros, utilizou-se um espectrômetro da Bruker Avance 400 MHz e a lignina (~ 50 mg) foi dissolvida em 0,50 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ). Os seguintes parâmetros de aquisição HSQC foram usados para a construção do diagrama de correlação 2D ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ): 12,5 ppm de largura espectral na dimensão F2 ( $^1\text{H}$ ) com 2048 aquisições e 204,8 ms de tempo de aquisição; 166 ppm de

largura espectral na dimensão F1 ( $^{13}\text{C}$ ) com 256 aquisições e 7,68 ms de tempo de aquisição.

### 3.3.4 NMR de $^1\text{H}$ Quantitativo

Os grupos funcionais da lignina [metoxila (MeO); hidroxilas fenólicas (ArOH) e alifáticas (AlkOH)] foram estimados seguindo um método já estabelecido na literatura, em que os grupos funcionais são quantificados com base nos seus respectivos produtos acetilados.<sup>23,27</sup> Assim, 50 mg de acetato de lignina e 5 mg de *p*-nitrobenzaldeído (NBA) – utilizado como padrão interno – foram dissolvidos em 0,5 mL de  $\text{CDCl}_3$ . O espectro de NMR  $^1\text{H}$  foi obtido em um espectrofotômetro da Bruker Avance 400 MHz, com os seguintes parâmetros de aquisição: 20 ppm de largura espectral, 130 aquisições com 2 s de tempo de aquisição.

Os grupos funcionais da lignina foram quantificados a partir das razões de integração dos prótons de grupos funcionais do padrão interno de acordo com a Equação 5:

$$[(\text{MeO}); (\text{ArOH}); (\text{AlkOH})] \left( \frac{\text{mmol}}{\text{g lignina}} \right) = \frac{\frac{I_{\text{GF}}}{N_{\text{AC/MET}}} \times \frac{N_{\text{pNBA}}}{I_{\text{NBA}}} \times \frac{M_{\text{NBA}}}{MM_{\text{NBA}}} \times 1000}{M_{\text{AL}} - \frac{I_{\text{AC}}}{N_{\text{AC/MET}}} \times \frac{N_{\text{pNBA}}}{I_{\text{NBA}}} \times \frac{M_{\text{NBA}}}{MM_{\text{NBA}}} \times MM_{\text{AC}}} \quad \text{Eq. 5}$$

em que:  $I_{\text{GF}}$  é a integração dos prótons do grupo funcional quantificado [ $\delta$  4,10 – 3,10 ppm para MeO;  $\delta$  2,50 – 2,17 ppm para o grupo acetil correspondente às hidroxilas fenólicas (ArOH);  $\delta$  2,17 – 1,70 ppm para o grupo acetil correspondente às hidroxilas alifáticas (AlkOH)];  $N_{\text{AC/MET}}$  é o número de prótons presentes nos grupos acetila e metoxila (= 3);  $N_{\text{pNBA}}$  é o número de prótons presentes no anel benzílico do *p*-nitrobenzaldeído (= 4);  $I_{\text{NBA}}$  é a integração dos 4 prótons do padrão interno NBA ( $\delta$  8,40 – 8,20 ppm);  $M_{\text{NBA}}$  é a massa adicionada do NBA (5 mg);  $MM_{\text{NBA}}$  é massa molecular do NBA (= 151,12 g mol $^{-1}$ );  $M_{\text{AL}}$  é a massa adicionada de acetato de lignina (50 mg);  $I_{\text{AC}}$  é a integração total de prótons dos grupos acetilados correspondentes às hidroxilas aromáticas e alifáticas (ArOH e AlkOH,  $\delta$  2,50 – 1,70 ppm);  $MM_{\text{AC}}$  é a massa molecular do grupo acetil menos 1 (43-1).

### 3.3.5 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Espectros de infravermelho da lignina e do acetato de lignina em pó foram obtidos na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em módulo de reflectância total atenuada (ATR) em um equipamento Cary 630 FTIR da Agilent Technologies® com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.6 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molar numérica média (Mn) e a massa molar ponderal média (Mw) foram estimadas por cromatografia de permeação em gel, usando um sistema de cromatografia líquida da Malvern, modelo VISCOTEK. As massas molares foram determinadas a partir do produto acetilado da lignina (1 mg) dissolvido em 1 mL de tetrahidrofurano (THF), de acordo com metodologias já reportadas na literatura.<sup>30,31</sup>

### 3.3.7 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

Utilizou-se um equipamento Zetasizer NANO-ZS-ZEN-3600 da Malvern Instruments Ltd. com *laser* de He-Ne (633 nm) em modo de retroespalhamento (173°), para obter informações acerca do diâmetro hidrodinâmico médio (avaliado em intensidade e número), do índice de polidispersidade (Pdl) e do potencial zeta das nanopartículas preparadas. As medidas foram obtidas a 25 °C, sendo a viscosidade do meio dispersante (água) 0,89 cP e índice de refração 1,330. As medidas de potencial zeta foram feitas em cubetas de policarbonato de 1 mL DTS1070 (Malvern Instruments Ltd.).

### 3.3.8 Estudo da Estabilidade das Nanopartículas em Função da Força Iônica do Meio

Para avaliar a estabilidade das nanopartículas com a força iônica do meio, a suspensão de nanopartículas preparada foi diluída para 0,05 % (m/v) em soluções de NaCl (Merck®) de  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-1}$ ,  $3 \times 10^{-1}$ ,  $7 \times 10^{-1}$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Após cada diluição, o diâmetro hidrodinâmico médio e o potencial zeta foram medidos e representados graficamente em função da concentração de NaCl. As medidas foram realizadas em triplicata sob temperatura constante de 20 °C.

### 3.3.9 Estudo da Estabilidade das Nanopartículas em Função do pH do Meio e Determinação do Ponto Isoelétrico

Para estudar o comportamento das nanopartículas preparadas em função do pH do meio e determinar o ponto isoelétrico, utilizou-se um módulo de titulação automatizado MPT-2 Titrator da Malvern Instruments® acoplado ao Zetasizer. Os titulantes utilizados foram HCl (0,1 e 0,25 mol L<sup>-1</sup>) e NaOH (0,1 e 0,25 mol L<sup>-1</sup>), ambos preparados com água tipo I (MilliQ). Inicialmente, determinou-se o pH inicial da suspensão de nanopartículas e o titulador foi programado para dispensar volumes de titulante tal que a variação do pH do meio fosse de 0,2 unidades a partir do pH inicial até pH 2 e pH 13, separadamente. A cada adição, o diâmetro hidrodinâmico médio e o potencial zeta das nanopartículas foram medidos. As medidas foram realizadas em triplicata sob temperatura constante de 20 °C.

### 3.3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (FESEM)

Com o objetivo de caracterizar a morfologia das nanopartículas, foram obtidas imagens de elétrons secundários por FESEM (Quanta FEG 250, FEI). O equipamento foi operado com tensão de 5 kV e distância de trabalho de 10 mm. As nanopartículas foram depositadas em lâminas de mica e metalizadas com Ir com corrente de 11,3 mA por 90 s no metalizador Baltec MED 20. Obteve-se um histograma da distribuição de tamanhos de nanopartículas a partir da contagem de 500 partículas em 5 imagens diferentes no *software* ImageJ.

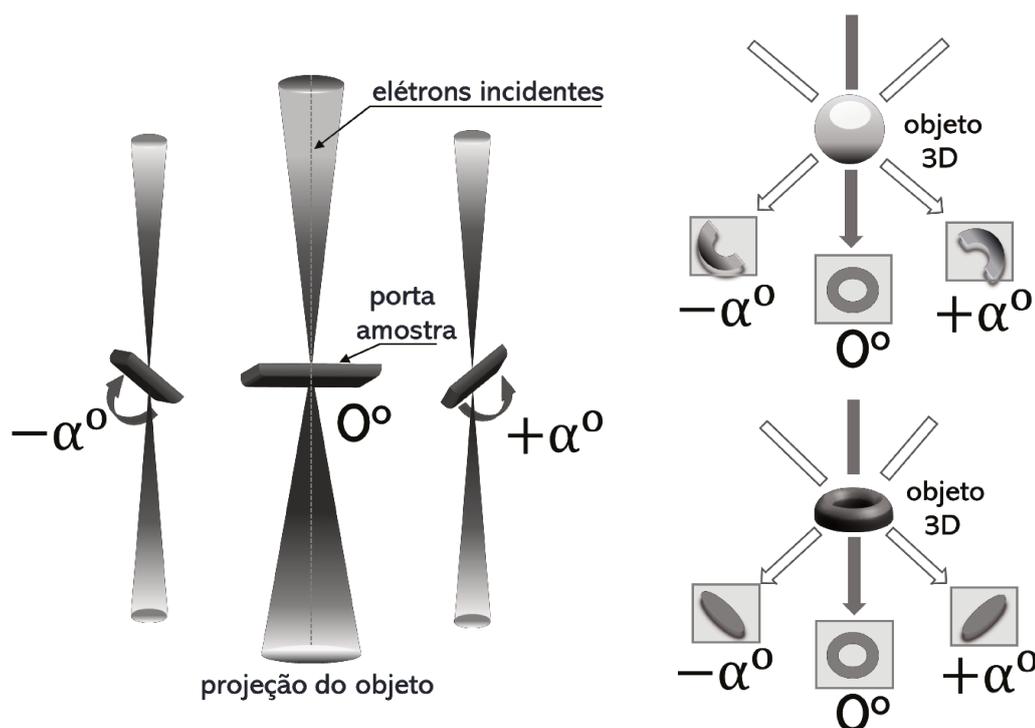
### 3.3.11 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM)

Para analisar o efeito do pH do meio dispersante na estabilidade da suspensão de nanopartículas de lignina, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de transmissão e varredura no equipamento FESEM (Quanta FEG 250, FEI) com detector de diodo de estado sólido de dois segmentos (STEM I). O equipamento foi operado com tensão de 10 kV e distância de trabalho de 5 mm. Para esta análise, as nanopartículas foram preparadas e o pH do meio dispersante foi ajustado para 2, 7 e 12 com a adição de

HCl ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) e NaOH ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ). Em seguida, a suspensão de cada pH foi gotejada (1 gota) sobre a superfície da grade de cobre (Ted Pella, Inc., 400 mesh) e deixadas para secar em um dessecador.

### 3.3.12 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para analisar a morfologia das nanopartículas com maior detalhamento, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) no equipamento Carl Zeiss Libra 120 com filamento de tungstênio operado a 80 kV. A suspensão de nanopartículas ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi depositada (1 gota) sobre a superfície da grade de cobre (Ted Pella, Inc., 400 mesh) e analisada após secagem. Para obter a série angular de imagens de TEM, a amostra foi colocada em um suporte de tomografia eletrônica de alta inclinação (Gatan Modelo 916) e o equipamento foi operado a 120 kV. A série angular foi obtida no intervalo  $[+ 60^\circ, - 60^\circ]$  com passo de 1 grau. Na *Figura 14*, é apresentado um esquema da rotação do porta amostra para a obtenção da série angular, que permite a elucidação do formato de objetos tridimensionais.

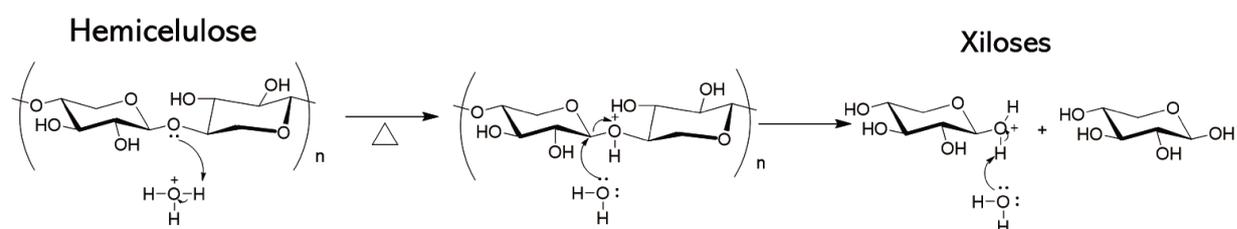


**Figura 14.** Representação esquemática da obtenção da série angular de imagens no microscópio eletrônico de transmissão.

## 4. Resultados e Discussão

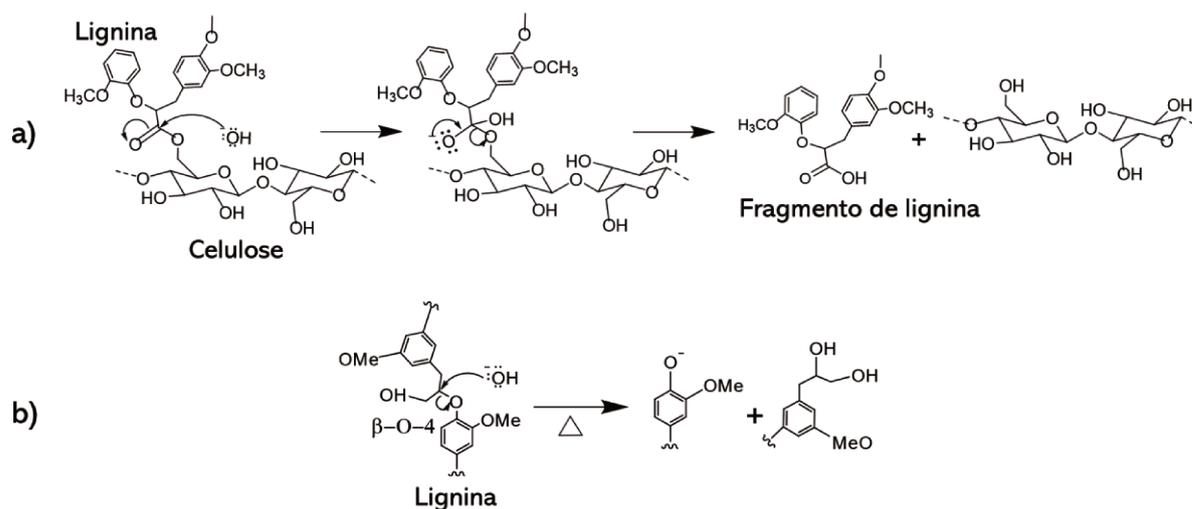
### 4.1 Fracionamento e Caracterização da Lignina do Capim Elefante

Para isolar a lignina do capim elefante, a biomassa *in natura* passou por um tratamento subdividido em duas etapas: na primeira etapa – tratamento ácido – ocorre a hidrólise ácida da biomassa levando, principalmente, à remoção da hemicelulose da parede celular vegetal e expondo a lignina do capim elefante para reagir com a solução de NaOH utilizada na etapa seguinte. Na *Figura 15* é apresentado o mecanismo proposto na literatura para a hidrólise da hemicelulose, representada pela cadeia de xilano, na parede celular.<sup>113</sup> Esse tratamento inicial também é importante para a obtenção de um licor básico mais rico em lignina pura.



**Figura 15.** Esquema da hidrólise ácida das ligações glicosídicas da hemicelulose, representada pela cadeia de xilano, levando à formação de monossacarídeos representados pelas xiloses.<sup>113</sup>

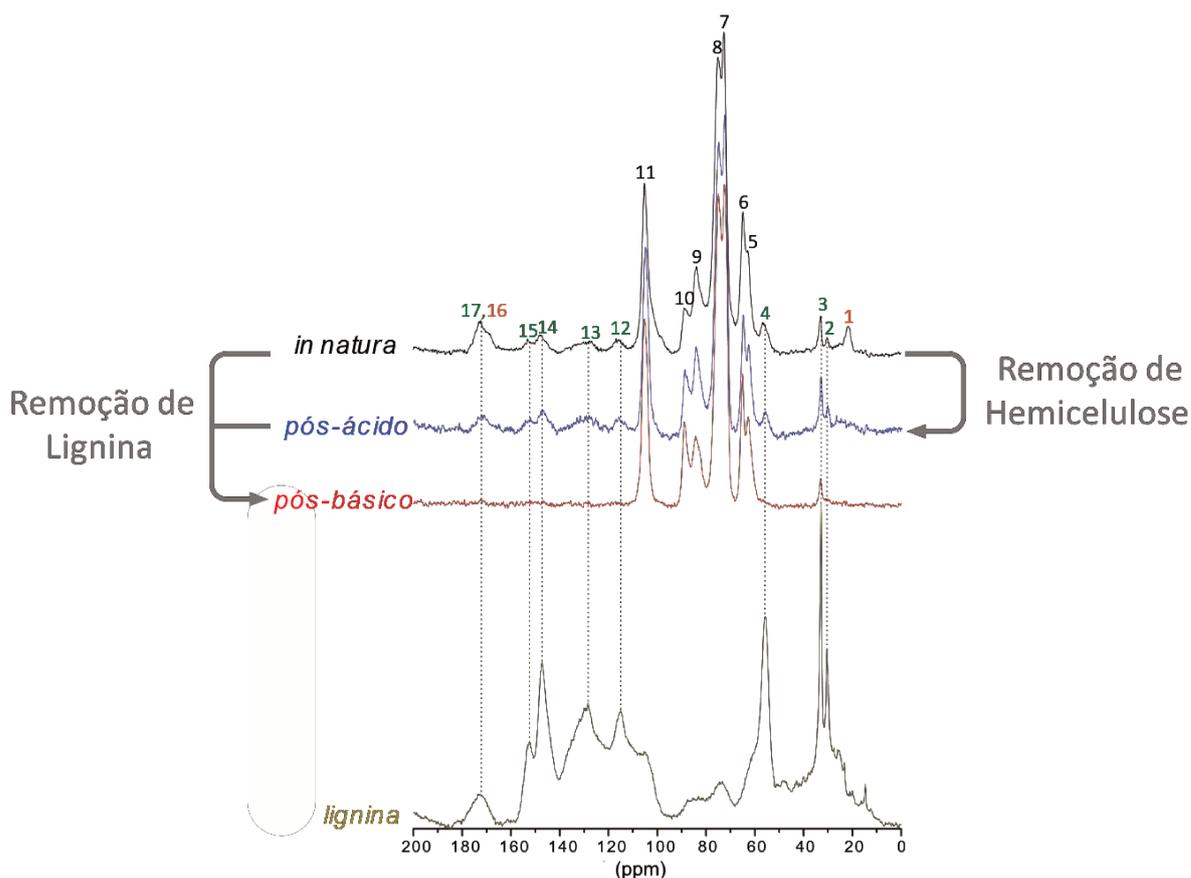
Na segunda etapa, o tratamento com o hidróxido de sódio leva à deslignificação da biomassa. As ligações éster e éter entre a celulose e a lignina são hidrolisadas, bem como as ligações carbono-oxigênio ( $\alpha\text{-O-4'}$  e  $\beta\text{-O-4'}$ ), presentes na estrutura da macromolécula (*Figura 16*). A hidrólise das ligações éter arílicas da lignina resulta na formação de grupos fenólicos, que se encontram dissociados no meio alcalino (*Figura 16*). A lignina é recuperada, então, quando estes grupos são protonados com a adição de ácido sulfúrico.<sup>27,44</sup>



**Figura 16.** Esquemas dos mecanismos de hidrólise básica das ligações C – O **a)** entre celulose e lignina e **b)** entre ligações éter arílicas na estrutura da lignina.

A biomassa *in natura*, os substratos obtidos após cada tratamento e a lignina isolada foram analisados por NMR de sólidos (CPMAS) para o núcleo de  $^{13}\text{C}$ , para investigar a evolução da composição química do capim após cada etapa do tratamento e caracterizar a lignina isolada. A técnica utilizada, com rotação da amostra em torno do ângulo mágico e polarização cruzada (CPMAS), permite a obtenção de espectros com boa relação sinal/ruído, no entanto, a intensidade dos picos obtidos com esta técnica é dependente da densidade local de  $^1\text{H}$ .<sup>107</sup> Consequentemente, ela não reflete a real quantidade de átomos de carbono no material analisado e não pode ser utilizada como técnica quantitativa, sem o uso de um padrão interno ou vários períodos de contato (Multi-CP).<sup>114</sup> Apesar disso, ela é uma excelente técnica para a identificação qualitativa das alterações químicas que ocorrem durante o fracionamento da biomassa.

Na *Figura 17*, são apresentados os espectros de ssNMR –  $^{13}\text{C}$  (CPMAS) obtidos para a biomassa *in natura*, para os substratos obtidos após cada tratamento e para a lignina isolada. O espectro do capim elefante antes do tratamento (*in natura*), assemelha-se bastante com espectros obtidos para amostras de outras gramíneas, como o bagaço de cana-de-açúcar.<sup>107</sup> É possível observar que os sinais desse espectro (descritos na *Tabela 2*) são, basicamente, decorrentes dos sinais de celulose, hemicelulose e lignina.



**Figura 17.** Espectros de NMR <sup>13</sup>C em estado sólido (CPMAS) obtidos para a biomassa *in natura*, para os substratos isolados após o tratamento ácido (*pós-ácido*), básico (*pós-básico*) e o espectro obtido para a **lignina** isolada do capim elefante. Os números em preto indicam os sinais da celulose, em laranja, da hemicelulose e, em verde, os da lignina.

Os sinais da lignina concentram-se, principalmente, nas faixas de 30 a 60 ppm e de 100 a 200 ppm e seus deslocamentos químicos também são apresentados na *Tabela 2*. O espectro referente aos substratos isolados após o tratamento ácido, evidencia, claramente, a remoção da hemicelulose; visto que o sinal em 21,6 ppm (Sinal **1**), exclusivo do CH<sub>3</sub> de grupos acetilas de hemiceluloses, desaparece em relação ao espectro da biomassa *in natura*. Além disso, é possível afirmar que a lignina do capim permanece contida nos substratos obtidos após o tratamento ácido. Observa-se, ao comparar os sinais da lignina isolada com os respectivos sinais no espectro (*pós-ácido*), que há um aumento relativo na intensidade desses sinais em comparação com os sinais da lignina no espectro da biomassa *in natura*.

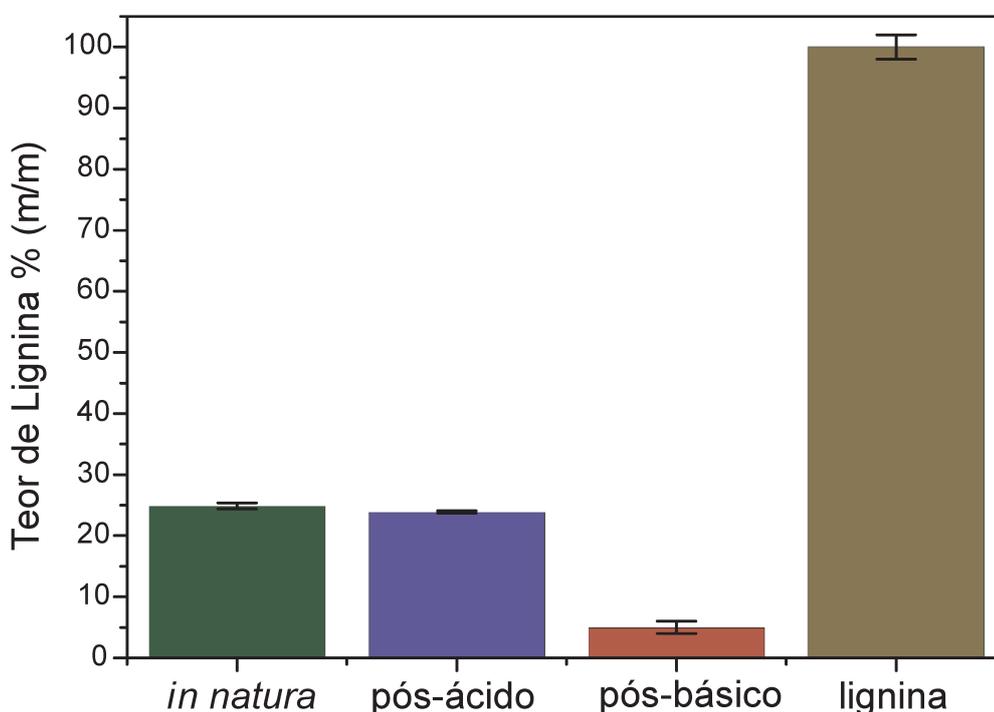
**Tabela 2.** Atribuição dos sinais de ssNMR –  $^{13}\text{C}$  (CPMAS) da biomassa *in natura* e da lignina isolada. As atribuições em laranja e verde são exclusivas da hemicelulose e da lignina, respectivamente.<sup>107</sup>

<i>Sinal</i>	<i>Deslocamento químico <math>^{13}\text{C}</math> (ppm)</i>	<i>Provável atribuição</i>
1	21,6	CH <sub>3</sub> em grupo acetila de hemiceluloses
2	31	CH <sub>3</sub> de carbonos alifáticos da lignina
3	33	C <sub>α</sub> em arilpropanol
4	55	Metoxila ligada ao anel aromático
5	62,5	Carbono C <sub>6</sub> de celulose não-cristalina, C <sub>6</sub> de hemiceluloses e OC <sub>γ</sub> H <sub>2</sub> de lignina
6	64,8	Carbono C <sub>6</sub> de celulose cristalina
7	72,5	C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> e C <sub>5</sub> de celulose e C <sub>α</sub> de lignina
8	75	C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> e C <sub>5</sub> de celulose e hemiceluloses
9	84	C <sub>4</sub> de celulose não-cristalina e de hemiceluloses, OC <sub>β</sub> H <sub>2</sub> de lignina
10	88	Carbono C <sub>4</sub> de celulose cristalina
11	105	Carbono C <sub>1</sub> de celulose
12	116	Carbonos C <sub>5</sub> de guaiacil e C <sub>3</sub> ; C <sub>5</sub> de <i>p</i> -hidroxifenil
13	128	Carbonos C <sub>2</sub> e C <sub>6</sub> de <i>p</i> -hidroxifenil
14	148	Carbonos C <sub>3</sub> e C <sub>4</sub> de guaiacil
15	153	Carbonos C <sub>3</sub> e C <sub>5</sub> de siringil (ligação β-O-4)
16	173	Grupos carboxílicos de hemiceluloses
17	163-178	Grupos carboxílicos (ácidos alifáticos e/ou éster) de lignina

Como era esperado, após o tratamento sequencial ácido-base, a lignina foi extraída da matriz celulósica, o que é evidenciado no espectro referente às fibras isoladas após o tratamento básico (*pós-básico*). A intensidade dos sinais referentes à lignina reduz drasticamente neste espectro, sendo que, apenas o sinal mais intenso em 33 ppm (Sinal 3) pode ser observado. Este resultado fornece indícios da extração eficiente da lignina e sua transferência para o licor básico com o método adotado.

Para comprovar esta eficiência, o teor de lignina na biomassa *in natura* e nos sólidos recuperados após cada etapa do tratamento foi determinado pelo método espectrofotométrico LSBA (Lignina Solúvel em Brometo de Acetila). O teor de lignina das folhas do capim elefante reduziu de (24,9 ± 0,5) % para (5,0 ± 1,0) % após o tratamento

ácido-base sequencial. Na *Figura 18*, onde é apresentado o resultado da quantificação de lignina nos sólidos, observa-se que os resultados corroboram com as informações extraídas dos espectros de NMR  $^{13}\text{C}$  em estado sólido e a lignina isolada apresentou pureza de  $(100 \pm 2) \%$ . Este valor também foi determinado pelo método LSBA, como apresentado na seção experimental no item 3.3.2



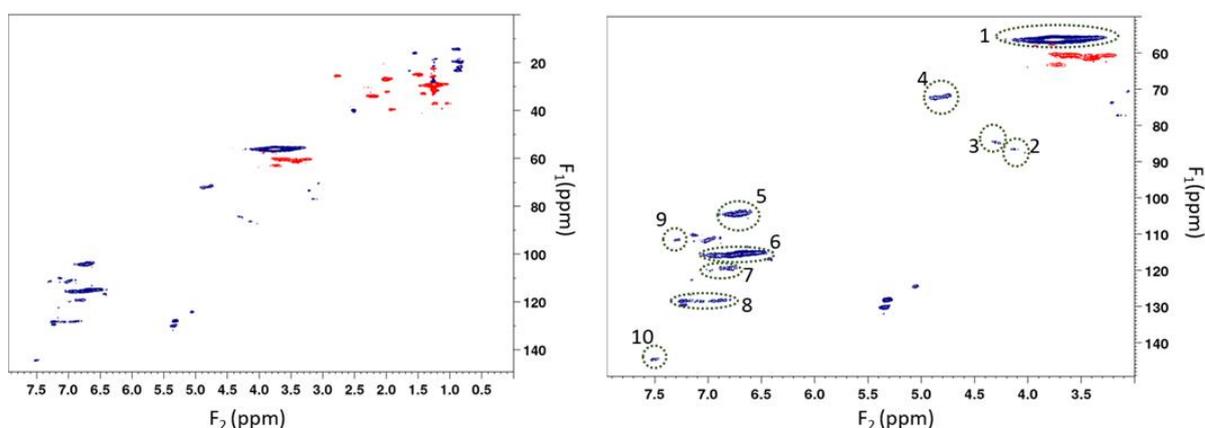
**Figura 18.** Teor de lignina na biomassa *in natura*, nos sólidos recuperados após cada etapa do pré-tratamento (pós-ácido e pós-básico) e pureza da lignina extraída.

O pré-tratamento ácido-base mostrou-se bastante eficiente para extração da lignina das folhas do capim elefante, visto que o rendimento de lignina recuperada foi de  $(40 \pm 2) \%$  (m/m) em comparação com o teor de lignina na biomassa *in natura*. Ademais, foi possível recuperar  $(85 \pm 5) \%$  (m/m) da lignina que encontrava-se solubilizada no licor básico e apenas  $(5 \pm 1) \%$  (m/m) permaneceu contida nas fibras de celulose (pós-básico na *Figura 18*). Estes valores são consistentes com os valores tipicamente reportados na literatura para tratamentos com NaOH diluído e maiores que os rendimentos reportados para a extração de lignina do bagaço de cana-de-açúcar que variam de 5,5 a 13%.<sup>23,44,115</sup> Adicionalmente, apesar da fração inorgânica (cinzas) ter sido removida na etapa alcalina, os ciclos de lavagem e centrifugação da lignina precipitada foram suficientes para remover

os constituintes inorgânicos, visto que o teor de cinzas na lignina extraída foi de apenas  $(0,37 \pm 0,07) \%$ .

Lukasik e colaboradores também extraíram a lignina do capim elefante aplicando o método organossolve usando imidazol como solvente.<sup>23</sup> No entanto, para obter um rendimento de 82% de recuperação de lignina, o tempo (5 h) e a temperatura ( $135,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ) foram superiores aos utilizados no pré-tratamento ácido-base. Ademais, os autores não recuperaram a lignina extraída pelo método organossolve, tampouco a caracterizaram.

A lignina isolada neste trabalho de mestrado também foi caracterizada por NMR 2D (HSQC) e o diagrama de correlação ( $^{13}\text{C}$ – $^1\text{H}$ ) obtido é apresentado na *Figura 19*, cujas atribuições químicas mais importantes são apresentadas na *Tabela 3*. Os sinais do diagrama na região de aromáticos permitiram a identificação das unidades de siringil (**S**), guaiacil (**G**) e *p*-hidroxifenil (**H**), como é esperado para ligninas de gramíneas. Além disso, também foi possível identificar a presença da subestrutura de fenilcoumarano (**A**) e cinamato (**B**), de acordo com resultados previamente relatados por Ragauskas e colaboradores para lignina de milho.<sup>116</sup> A análise do diagrama também demonstrou que a lignina isolada possui sinais referentes à ligação  $\beta$ -O-4' (sinais 3 e 4), que é o tipo de ligação predominante (proporções de 40 – 60%) na estrutura da lignina.<sup>27</sup>

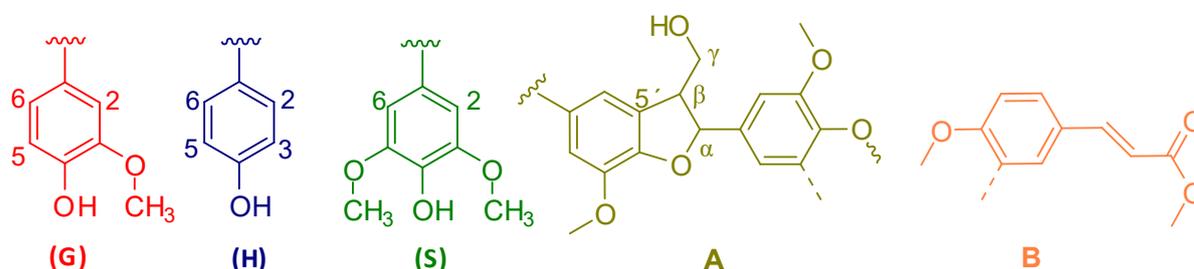


**Figura 19.** Diagrama de correlação 2D  $^{13}\text{C}$ (F1) –  $^1\text{H}$ (F2) HSQC da lignina isolada após o pré-tratamento ácido-base do capim elefante; os sinais em azul são positivos e os em vermelho são negativos. Os sinais identificados de 1 – 10 no espectro ampliado são atribuídos na *Tabela 3*.

Trabalhos reportados na literatura indicam que o principal mecanismo de quebra da lignina (em reações químicas catalisadas por soluções alcalinas) é a cisão da ligação carbono-oxigênio  $\beta$ -O-4'.<sup>27</sup> Isto posto, a presença dessas ligações éter arilglicerol- $\beta$ -arila no diagrama de correlação HSQC indica que o tratamento alcalino com NaOH 2% (m/v) não acarretou em uma fragmentação severa da lignina. Este é um resultado importante, pois, sob as condições de pré-tratamento estabelecidas, a lignina sofreu pouca modificação estrutural. Por outro lado, a clivagem das ligações  $\beta$ -O-4' durante o tratamento alcalino é importante para a atividade antioxidante da lignina,<sup>90</sup> que depende da presença de hidroxilas fenólicas (ArOH), como será discutido nas próximas seções.

**Tabela 3.** Atribuição dos sinais de correlação  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  do espectro HSQC da lignina isolada do capim elefante. Os sinais 1 a 10 estão indicados na *Figura 19*.<sup>116</sup>

Sinal	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Atribuição
1	56,26/3,75	C/H do grupo metoxila
2	87,45/4,03	$\text{C}_{\alpha}/\text{H}_{\alpha}$ da subestrutura de fenilcumarano (A)
3	84,57/4,31	$\text{C}_{\beta}/\text{H}_{\beta}$ na ligação $\beta$ -O-4'
4	72,11/4,80	$\text{C}_{\alpha}/\text{H}_{\alpha}$ na ligação $\beta$ -O-4'
5	104,48/6,70	$\text{C}_{2,6}/\text{H}_{2,6}$ da unidade siringil (S)
6	115,41/6,67	$\text{C}_5/\text{H}_5$ da unidade guaiacil (G)
7	119,50/6,80	$\text{C}_6/\text{H}_6$ da unidade guaiacil (G)
8	128,48/7,23	$\text{C}_{2,6}/\text{H}_{2,6}$ da unidade p-hidroxifenil (H)
9	111,44/7,27	$\text{C}_2/\text{H}_2$ da unidade guaiacil (G)
10	155,53/7,51	$\text{C}_{\alpha}/\text{H}_{\alpha}$ em cinamato (B)



Ademais, foi possível identificar no diagrama (*Figura 19*) um sinal intenso (Sinal 1) referente aos grupos metoxila das subunidades guaiacil (G) e siringil (S). O resultado de NMR de  $^1\text{H}$  quantitativo para estimar a quantidade de metoxila na lignina (*Tabela 4*) corrobora com os resultados de HSQC, visto que há uma maior quantidade de

grupos metoxila por grama de lignina do que hidroxilas alifáticas e aromáticas, separadamente. Assim, é possível supor que um tratamento básico mais severo (por exemplo, com maiores concentrações de NaOH) resultaria em um aumento da quantidade de hidroxilas fenólicas, visto que um maior número de ligações arilglicerol- $\beta$ -arila seriam hidrolisadas levando a uma maior fragmentação da lignina.

Como o tratamento básico não levou a uma grande fragmentação da lignina, os valores de massa molar numérica média ( $M_n$ ) e de massa molar ponderal média ( $M_w$ ) obtidos foram elevados em comparação com os reportados na literatura para lignina alcalina ( $M_w = 800 - 15000 \text{ g mol}^{-1}$ ) (Tabela 4).<sup>32</sup>

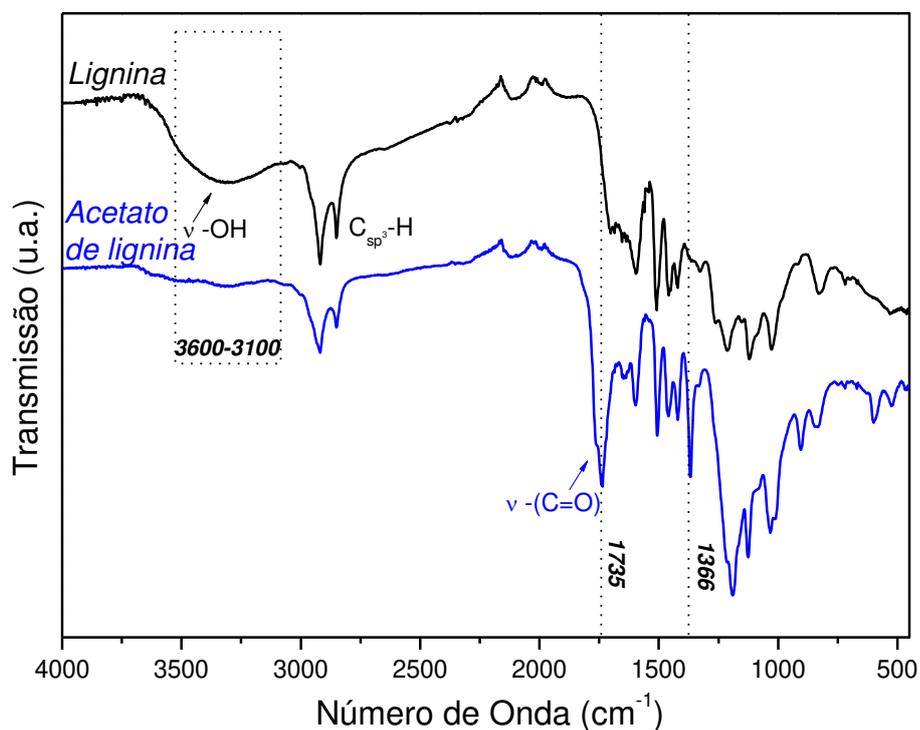
Este resultado corrobora com a proposição de que a lignina isolada sofreu pouca modificação estrutural durante o tratamento básico. Apesar da fragmentação moderada da rede macromolecular, a lignina ainda apresentou alta concentração de grupos fenólicos (ArOH, na Tabela 4) em comparação com os valores tipicamente relatados na literatura para a lignina Kraft e Soda ( $2,0 - 4,5 \text{ mmol g}^{-1}$ ).<sup>117</sup>

**Tabela 4.** Caracterização da lignina. As quantidades de grupos hidroxilas (aromáticas e alifáticas) e metoxilas foram determinadas por NMR de  $^1\text{H}$  quantitativo. A massa molar numérica média ( $M_n$ ) e a massa molar ponderal média ( $M_w$ ) foram estimadas por cromatografia de permeação em gel.

Quantidades de grupos hidroxilas e metoxilas.			Massas Molares		
ArOH (mmol/g Lignina)	AlkOH (mmol/g Lignina)	MeO (mmol/g Lignina)	$M_n$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$M_w$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$\frac{M_w}{M_n}$
3,85	4,90	5,86	4726	9184	1,94

A lignina isolada foi acetilada visando à investigação do efeito da diminuição da quantidade de hidroxilas fenólicas na superfície das nanopartículas de lignina preparadas, bem como a comparação da estabilidade coloidal, atividade antioxidante das nanopartículas de lignina (acetilada e não acetilada) e absorção UVA-UVB. Como apresentado na Figura 20, é possível afirmar que as hidroxilas presentes na estrutura da lignina foram acetiladas; como indicado pelas bandas em  $1735 \text{ cm}^{-1}$  (associadas ao estiramento da ligação  $\text{sp}^2 -\text{C}=\text{O}$  do grupo acetila) e em  $1366 \text{ cm}^{-1}$  (relacionada à deformação da ligação  $\text{sp}^3-\text{C}-\text{H}$  do grupo acetila). Complementarmente, a diminuição

considerável da banda alargada entre  $3600\text{ cm}^{-1}$  e  $3100\text{ cm}^{-1}$  – característica de hidroxilas de grupos fenólicos – indica, também, a obtenção do acetato de lignina.<sup>31</sup>



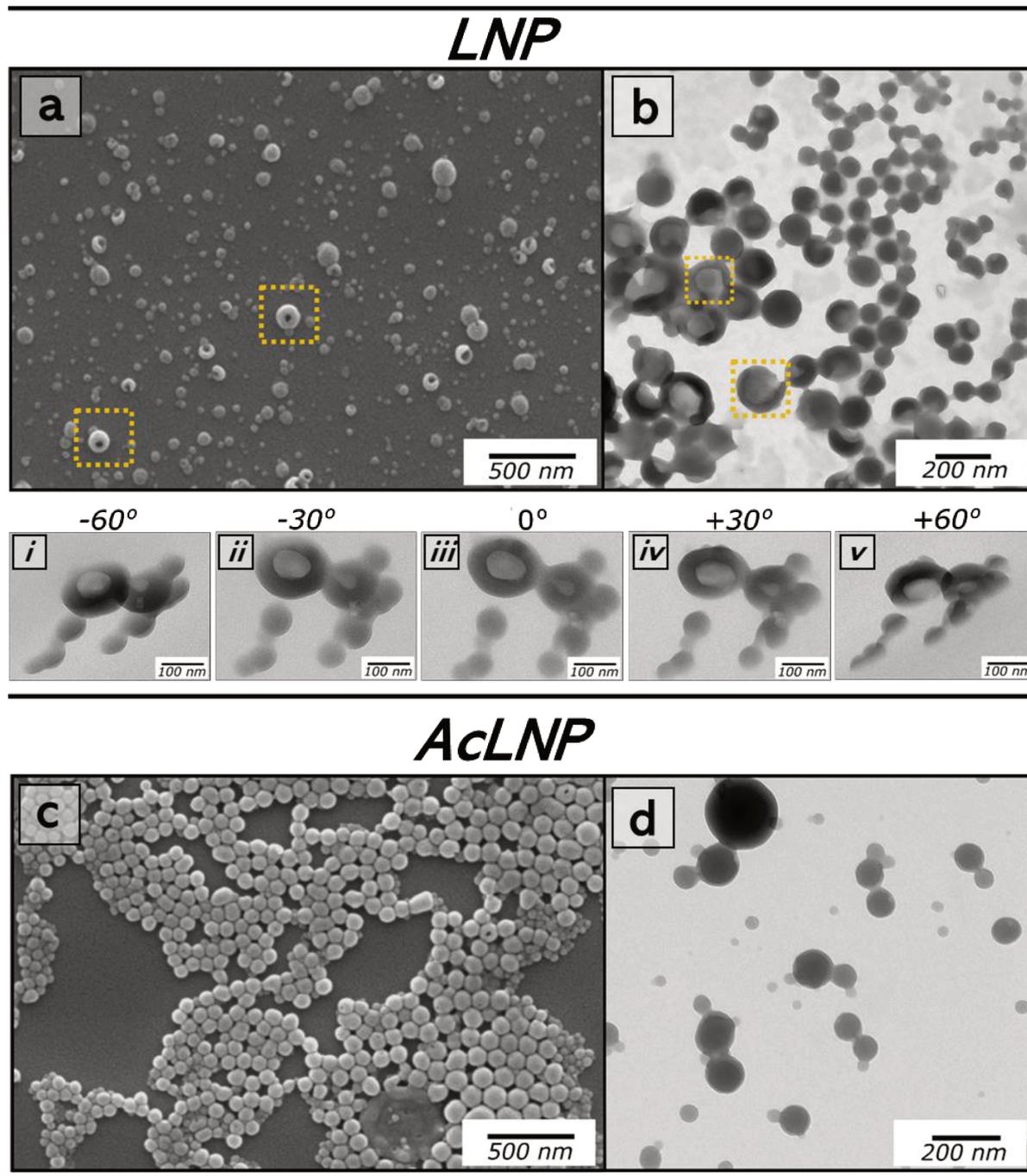
**Figura 20.** Espectros de FTIR da lignina isolada do capim elefante e da lignina após a reação de acetilação (acetato de lignina). A banda em  $1735\text{ cm}^{-1}$  no espectro do acetato de lignina indica a presença do grupo acetila. A ausência de uma banda alargada em  $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ , no mesmo espectro, confirma que as hidroxilas presentes na estrutura da lignina foram acetiladas.

## 4.2 Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Lignina

### 4.2.1 Auto-organização Induzida pela Adição de Não-Solvente (Água)

Tendo como base o método previamente reportado por Richter e colaboradores<sup>56</sup>, foi possível preparar nanopartículas de lignina (*LNP*) e de acetato de lignina (*AcLNP*) em formatos esféricos (*Figura 21*), por meio da adição de água como não-solvente às soluções de lignina e acetato de lignina, respectivamente. Como sugerido por Rao e colaboradores<sup>118</sup>, este resultado é uma consequência da maximização de interações  $\pi$ - $\pi$  de grupos aromáticos da lignina que encontram-se, principalmente, no núcleo da nanopartícula; e também, da maximização das forças intermoleculares entre os grupos polares orientados na superfície da partícula (ácidos carboxílicos, hidroxilas alifáticas e aromáticas) e a água.

A obtenção de nanopartículas de acetato de lignina (*AcLNP*) também já foi reportada na literatura, no entanto, na metodologia apresentada, Qian e colaboradores<sup>75</sup> usaram o brometo de acetila para acetilar a lignina, que é um reagente bastante tóxico. Adicionalmente, no trabalho deles, as nanopartículas são preparadas com troca (gota-a-gota) de solvente, o que resulta em uma suspensão bastante diluída de nanopartículas. Em contraste, no presente trabalho, a suspensão de nanopartículas de acetato de lignina foi preparada por um método mais simples (com adição de não-solvente de uma só vez) e o acetato de lignina utilizado foi preparado com anidrido acético, que é menos tóxico que o brometo de acetila. O método de acetilação aqui empregado também requer o uso de piridina que, embora seja um reagente tóxico, pode ser recuperada da solução aquosa por meio de uma extração líquido-líquido aplicando, por exemplo, acetato de etila.<sup>119</sup>



**Figura 21.** a) e c) Micrografias de FESEM das nanopartículas de lignina (*LNP*) e das nanopartículas de acetato de lignina (*AcLNP*), respectivamente – ambas foram preparadas pela adição de não-solvente; b) e d) micrografias de TEM das respectivas nanopartículas (*LNP* e *AcLNP*). A seqüência (i–v) mostra a série angular de  $-60^\circ$  a  $+60^\circ$  para comprovar a presença de nanopartículas que apresentam estruturas do tipo “esfera oca”, as quais foram observadas e destacadas em a) e b) pelos quadrados tracejados.

Micrografias de FESEM e de TEM mostraram que algumas *LNPs* – com diâmetros maiores que 100 nm – formam estruturas do tipo “esfera oca” com um único buraco (como as mostradas pelos quadrados tracejados nas Figuras 21a e 21b). Com a

rotação do suporte de amostra no microscópio eletrônico de transmissão, foi possível obter a série angular de  $-60^\circ$  a  $+60^\circ$  (Figura 21, *i – v*) que comprovou a observação inicial da obtenção de nanopartículas maiores com estruturas de esferas ocas e não de partículas achatadas no formato de um toróide (semelhante a uma boia salva-vidas). Nas imagens de TEM sem rotação, as duas morfologias (esferas ocas ou toróides) possuem morfologia semelhante em 2D, mas a série angular permite diferenciá-las. Tendo em vista que as nanopartículas de lignina são formadas com o processo de auto-organização das macromoléculas quando a água é adicionada à solução de lignina; a questão que se põe aqui é: por que as macromoléculas de lignina se organizam de modo a formar nanopartículas inteiriças e nanoesferas ocas?

Para responder esta questão, precisamos considerar as forças motrizes para a auto-organização das moléculas, que consistem nas forças intermoleculares do tipo  $\pi$ - $\pi$  de grupos aromáticos, ligações de hidrogênio, forças dispersivas de van der Waals, forças elétricas e o efeito hidrofóbico.<sup>76,118,120</sup> O processo de auto-organização para formação das nanopartículas inteiriças é, de certo modo, mais fácil de elucidar, e ele se baseia na forte tendência das moléculas de água em estabelecerem ligações de hidrogênio entre si – o denominado efeito hidrofóbico. Estudos teóricos e experimentais mostram que a organização das moléculas de água ao redor de superfícies hidrofóbicas é entropicamente desfavorável, visto que, nesse caso, os graus de liberdade das moléculas de água que circundam a superfície ficam mais restritos.<sup>120</sup> Assim, o ganho entrópico na liberação das moléculas de H<sub>2</sub>O compensa a perda entrópica associada à formação dos agregados de lignina.

As moléculas de lignina se agregam de modo a aumentar as interações intermoleculares  $\pi$ - $\pi$  dos anéis aromáticos e diminuir a área superficial total solvatada pelas moléculas de água. Nesta conformação, os grupos polares (grupos fenólicos, ácidos carboxílicos e hidroxilas alifáticas) encontram-se dispostos na superfície, visto que eles são capazes de estabelecer ligações de hidrogênio eficientes com a água.

Por outro lado, a explicação da formação das nanopartículas ocas não é tão trivial quanto ao que foi posto para as nanopartículas inteiriças. Contudo, é possível

conjecturar que estas estruturas são provindas de vesículas, as quais também são formadas como consequência do efeito hidrofóbico, quando se adiciona o não-solvente. Vesículas são bicamadas esféricas, em que os blocos hidrofóbicos insolúveis constituem a parede da bicamada e os blocos hidrofílicos estão orientados para o meio de dispersão (neste caso, água) nas interfaces interna e externa.<sup>121,122</sup>

Tendo em vista que a lignina é uma macromolécula anfifílica, uma possível explicação para a formação dessas estruturas vesiculares é que, nesta conformação estrutural, há um aumento na densidade de interações intermoleculares entre os grupos hidrofílicos da lignina e a água nas interfaces. Outra evidência, que corrobora com esta hipótese, é o fato das *AcLNPs* formarem menos estruturas ocas, visto que elas apresentam menor quantidade de grupos hidroxila em comparação com as *LNPs* (Tabela 5). Deste modo, a diminuição da área superficial por volume não impacta, consideravelmente, na densidade de interações intermoleculares polares, como acontece para as *LNPs* maiores que se apresentam ocas.

Em um trabalho recente, Chu e colaboradores<sup>76</sup> exploraram o mecanismo de formação das nanoesferas ocas de lignina proveniente de hidrólise enzimática. Eles dissolveram a macromolécula em THF e prepararam as nanopartículas ocas com a adição de água como não-solvente. Seguindo o que foi apresentado no trabalho deles, a auto-organização da lignina em estruturas ocas ocorre devido à presença de uma pequena quantidade de impurezas no THF, o que levou à separação de fases entre o solvente e a água. No entanto, nós sabemos que a acetona (padrão analítico) e a água, utilizadas em nosso trabalho, são completamente miscíveis e não formam um sistema de nanoemulsão molde para a estruturação das esferas ocas. Assim, a explicação proposta no trabalho com THF não se aplica em nosso sistema.

No caso das *LNPs* ocas, uma explicação mais plausível é que as estruturas vesiculares sejam formadas inicialmente em suspensão aquosa, como consequência do efeito hidrofóbico e da otimização das interações intermoleculares  $\pi$ - $\pi$  entre os blocos aromáticos da lignina e, posteriormente, as esferas ocas são formadas com a evaporação da água.

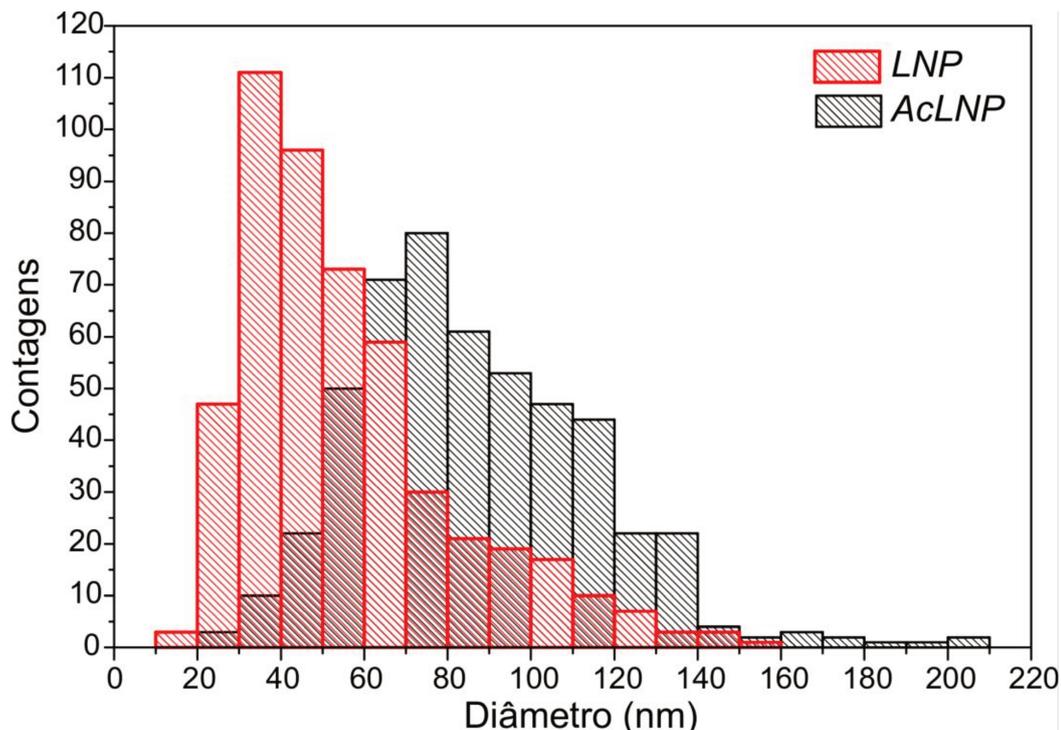
**Tabela 5.** Concentração total de grupos ionizáveis (ácidos fortes e fracos) presentes na superfície das nanopartículas de lignina (*LNP* e *AcLNP*) e na superfície da lignina bulk ( $10^2 - 10^3 \mu\text{m}$ ) em suspensão. As concentrações foram determinadas por titulação condutimétrica.

	Concentração ( $\text{mmol g}^{-1}$ )		
	<i>LNP</i>	<i>AcLNP</i>	<i>Lignina Bulk</i>
Ácidos fortes	$(0,9 \pm 0,8)$	0	$(0,2 \pm 0,1)$
Ácidos fracos	$(2,0 \pm 0,3)$	$(1,0 \pm 0,2)$	$(0,7 \pm 0,1)$
Concentração total de grupos ionizáveis*	$(3,0 \pm 1,0)$	$(1,0 \pm 0,2)$	$(0,9 \pm 0,2)$

\*Somatório de hidroxilas fenólicas e de ácido carboxílico

Como apresentado na *Tabela 5*, as *LNPs* têm maior concentração total de grupos ionizáveis (ácidos fortes e fracos) na superfície do que a lignina *bulk*, visto que elas apresentam maior área superficial por volume, como consequência das dimensões nanométricas. Assim, este resultado corrobora com a premissa de que, ao diminuir o tamanho da partícula, tem-se maior quantidade de hidroxilas dispostas na superfície. Já as *AcLNPs*, possuem menor concentração de grupos ionizáveis, visto que grande parte das hidroxilas foram acetiladas.

Na *Figura 22* são apresentados os histogramas da distribuição de tamanho (maior diâmetro medido para cada partícula) das nanopartículas de lignina (*LNP*) e de acetato de lignina (*AcLNP*). O diâmetro médio para a *LNP* foi de  $(55 \pm 26)$  nm e para a *AcLNP* foi de  $(86 \pm 29)$  nm, ambas as distribuições mostram que tanto as *LNPs* como as *AcLNPs* são moderadamente dispersas em termos de tamanhos. As nanopartículas de lignina acetilada (*AcLNP*) apresentaram distribuição de tamanhos maiores que as *LNPs*. Uma possível explicação para isso pode estar relacionada com o fato das *AcLNPs* terem grupos acetatos, que podem estabelecer interações  $\pi - \pi$  com os anéis aromáticos da lignina e, portanto, encontrarem-se no interior das nanopartículas (note que, estes grupos são as hidroxilas no caso das *LNPs*, que encontram-se majoritariamente na superfície).<sup>123</sup>

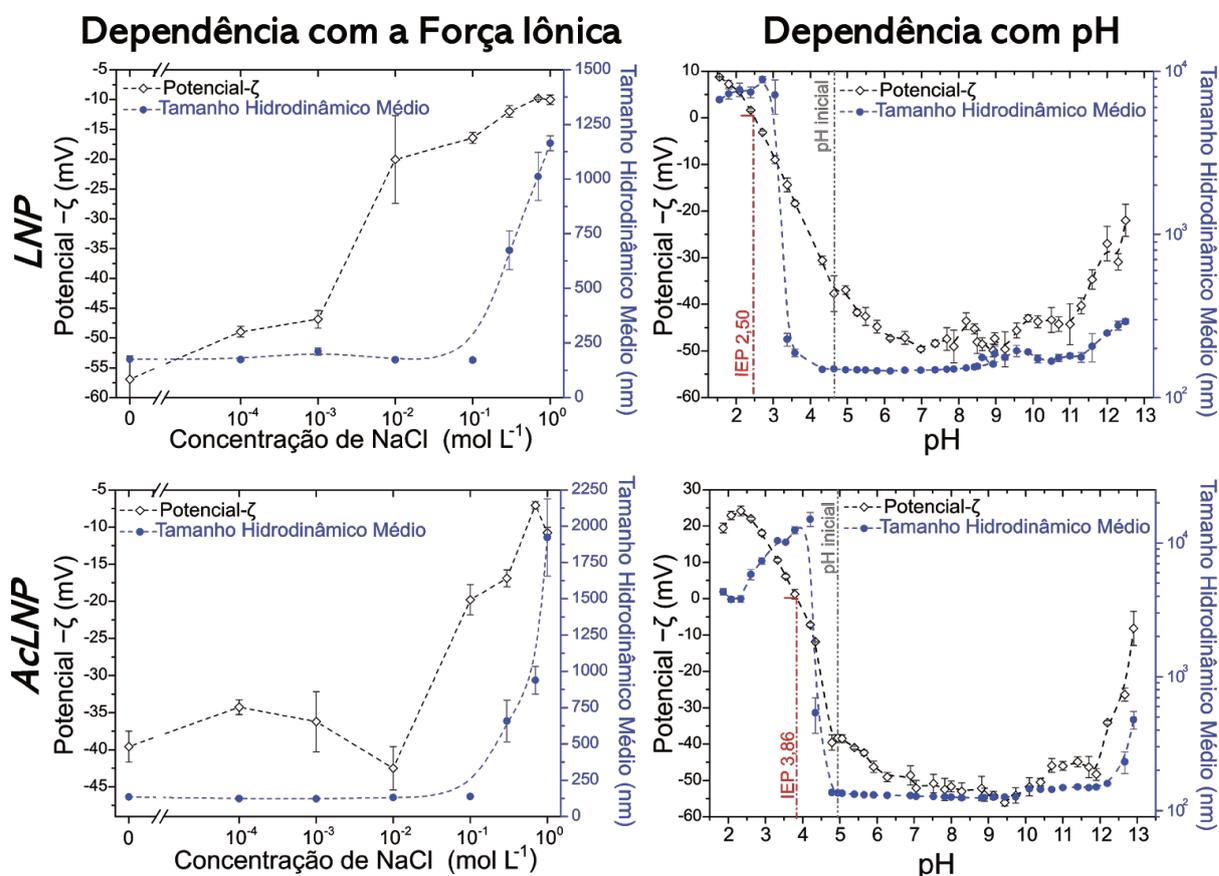


**Figura 22.** Histogramas das distribuições de tamanhos das nanopartículas (*LNP* e *AcLNP*) preparadas pela adição de não-solvente. Os diâmetros foram medidos manualmente (500 partículas foram contabilizadas) nas micrografias de FESEM utilizando o software ImageJ®. Para as *LNPs* os diâmetros mínimo e máximo contabilizados foram 16 nm e 155 nm, e para as *AcLNPs* foram 22 nm e 209 nm.

Como discutido anteriormente, as nanopartículas possuem hidroxilas de ácido carboxílico dissociáveis na superfície e, por isso, a dispersão é estabilizada devido à ação de forças repulsivas entre as duplas camadas elétricas, que se formam uma vez que as hidroxilas na superfície são dissociadas, como também em decorrência da adsorção de hidroxilas na superfície hidrofóbica. De acordo com a teoria DLVO, esta repulsão pode ser facilmente blindada com o aumento da força iônica do meio dispersante.<sup>124</sup> Por esta razão, investigou-se a estabilidade das nanopartículas frente à variação da força iônica da suspensão com adições sequenciais de NaCl.

O resultado, apresentado na *Figura 23*, mostra que a suspensão de *LNP* em água pura possui um potencial de, aproximadamente, -57 mV. Este potencial bastante negativo induz uma grande repulsão entre as nanopartículas, o que resulta em uma dispersão bastante estável até  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Não obstante, com o aumento da força iônica do meio para 0,01 a suspensão começou a se desestabilizar e o potencial diminuiu para |-20 mV| aproximadamente. Para concentrações de NaCl maiores que 0,01 mol L<sup>-1</sup>, o

potencial zeta diminui (em módulo) constantemente em toda faixa. Da mesma forma, o tamanho hidrodinâmico médio aumenta consideravelmente para valores de força iônica maiores que 0,01 – o que indica a agregação das partículas.

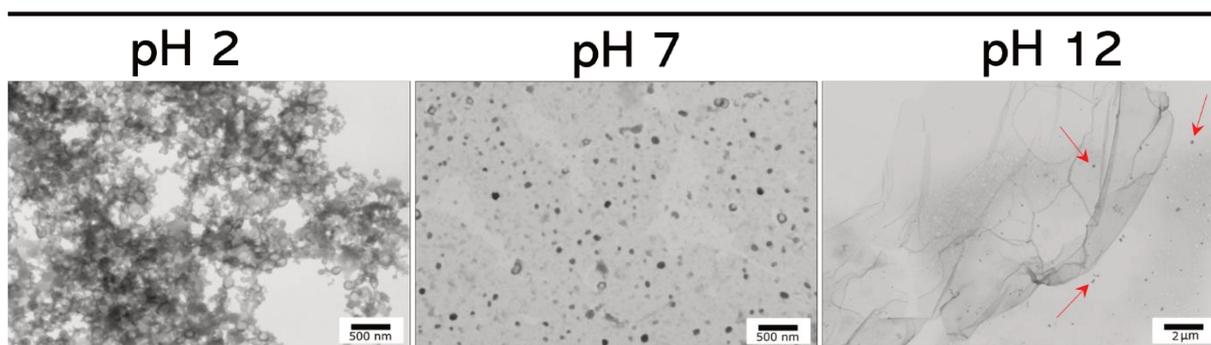


**Figura 23.** Estudo da estabilidade das nanopartículas (*LNP* e *AcLNP*) frente à variação da força iônica e do pH do meio dispersante. As *LNPs* apresentaram ponto isoelétrico (IEP) no pH=2,50 e estabilidade para concentrações de NaCl inferiores a 0,01 mol L<sup>-1</sup> e para valores de pH entre 4 e 12 ( $|\zeta| > 25$  mV). As *AcLNPs* apresentaram ponto isoelétrico (IEP) no pH= 3,86 e estabilidade para concentrações de NaCl inferiores a 0,01 mol L<sup>-1</sup> e para valores de pH entre 5 e 12 ( $|\zeta| > 25$  mV). As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.

Como apresentado na *Tabela 5*, as *AcLNPs* apresentam menor concentração total de grupos ionizáveis na superfície do que as *LNPs*, visto que os ácidos carboxílicos foram acetilados. Conseqüentemente, a suspensão de *AcLNPs* tem módulo menor de potencial zeta em água pura (-40 mV) e, como apresentado na *Figura 23*, as *AcLNPs* formam agregados de tamanhos maiores que os das *LNPs* para valores de força iônica maiores que 0,01.

O pH do meio dispersante é outra variável físico-química que influencia no potencial zeta das nanopartículas de lignina e, conseqüentemente, impacta na estabilidade das mesmas. Na *Figura 23*, é possível observar que, ao diminuir o pH da suspensão, o potencial zeta diminui (em módulo) progressivamente até 0 mV, no qual tem-se o ponto isoelétrico (IEP) no pH 2,50 para a *LNP* e pH 3,86 para a *AcLNP*. No ponto isoelétrico, ambas as suspensões de *LNP* e *AcLNP* perdem a estabilidade por completo.

Contrariamente, com o aumento do pH para valores próximos à neutralidade, maior quantidade de hidroxilas adsorvem na superfície das nanopartículas. Isto implica na estabilização mais eficiente da suspensão de nanopartículas. Finalmente, para valores de pH maiores que 12 (em ambos sistemas *LNP* e *AcLNP*) a dissociação das hidroxilas e a hidrólise alcalina do grupo acetato (para as *AcLNPs*) tornam-se muito mais pronunciadas e, conseqüentemente, as nanopartículas começam a se dissolver no meio alcalino. Na *Figura 24*, tem-se imagens de STEM (das *LNPs*) que corroboram com as informações obtidas com o estudo da estabilidade das nanopartículas frente à variação do pH.



**Figura 24.** Micrografias de STEM das nanopartículas de lignina (*LNP*) com ajuste do pH do meio dispersante para pH=2 (nanopartículas coalescidas), pH=7 (nanopartículas estabilizadas pela ação de forças repulsivas) ou pH=12 (maior parte das *LNPs* são solubilizadas formando um filme ao secar, contendo partículas maiores remanescentes – indicadas pelas setas. A escala dessa micrografia é de 2  $\mu\text{m}$ , diferente das demais).

Com o ajuste do pH do meio dispersante para 2 (inferior ao IEP), observou-se que as partículas coalescidas formaram aglomerados. Já com o ajuste do pH para 7, tem-se as nanopartículas bem definidas e separadas umas das outras. Adicionalmente, é possível observar na *Figura 23*, tanto para as *LNPs* como para as *AcLNPs*, que o tamanho hidrodinâmico médio das nanopartículas aumenta para valores de pH acima de 12. Aqui,

uma possível explicação é que as nanopartículas menores – as quais apresentam elevada área superficial por volume – se dissolvem mais rapidamente que as partículas maiores.<sup>125</sup> Este resultado é confirmado com a imagem de STEM das partículas com o ajuste do pH do meio para 12 (*Figura 24*); é possível observar na imagem, que as nanopartículas solubilizadas formaram um filme ao secar e que há algumas nanopartículas maiores remanescentes.

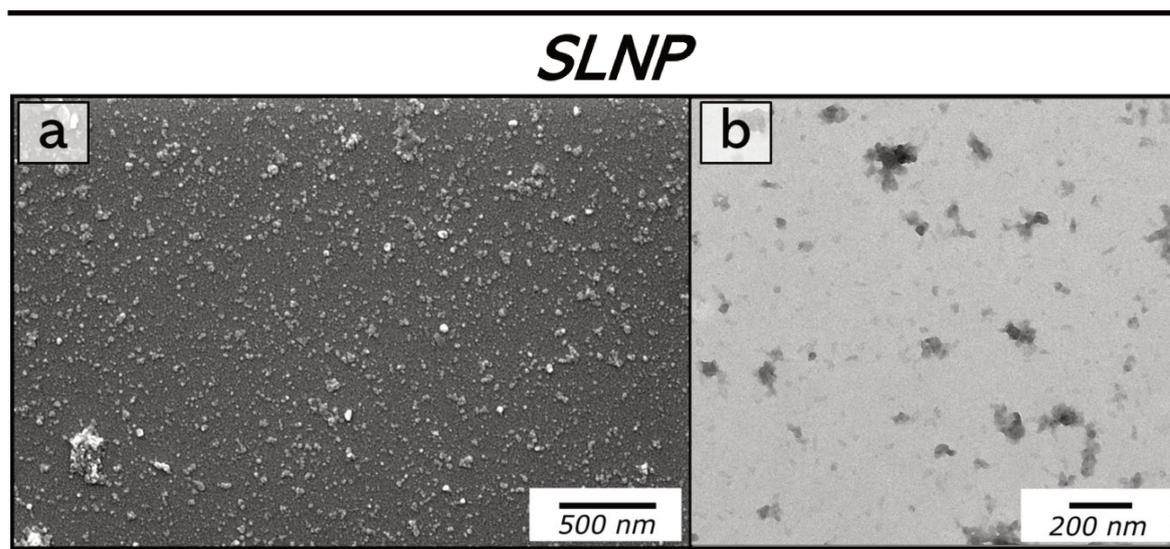
#### 4.2.2 Nanopartículas Obtidas com Cisalhamento Mecânico

Visando à obtenção de nanopartículas de lignina sem a necessidade de solubilizar a macromolécula em acetona, investigou-se, também, o preparo de nanoestruturas de lignina a partir do cisalhamento mecânico dos agregados formados após a acidificação do licor negro e das lavagens sequenciais. O método proposto neste trabalho foi, portanto, uma adaptação dos métodos mecânicos reportados na literatura – em que as nanopartículas são obtidas a partir da fragmentação (*top – down*) da lignina em pó dispersada em água.<sup>62,81</sup>

A vantagem dos métodos mecânicos consiste na diminuição de etapas para obtenção das nanopartículas e no conceito do preparo de nanomateriais exclusivamente com água, sem o uso de solventes orgânicos para preparar as soluções ou a necessidade de funcionalização química da lignina. No trabalho de Ragauskas e colaboradores<sup>62</sup>, nanopartículas de lignina foram preparadas dispersando a lignina (em pó) em água e homogeneizando a suspensão sob taxas elevadas de cisalhamento mecânico (15000 rpm por 4 h em um IKA Ultra-Turrax T-50). Nestas condições, as partículas de lignina são fragmentadas em agregados de tamanhos submicrométricos. A desvantagem desse método é a dificuldade de controlar a morfologia das nanopartículas, como também a elevada polidispersidade.

Dessa forma, foi proposto neste trabalho, o cisalhamento mecânico dos agregados que são formados ao acidificar o licor do tratamento básico. Visto que os agregados formados já se encontram em suspensão e têm tamanhos micrométricos, a fragmentação deles com o tratamento mecânico é facilitada. Na *Figura 25*, são

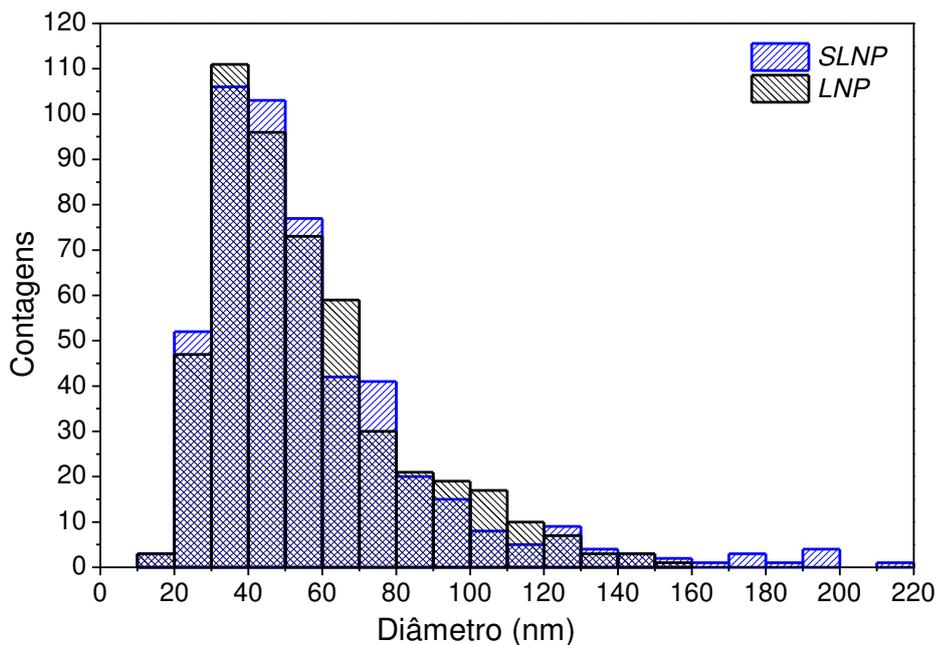
apresentadas as micrografias eletrônicas das nanopartículas obtidas com o tratamento mecânico (*SLNP* – S: do inglês, *shear*).



**Figura 25.** a) Micrografia de FESEM das nanopartículas de lignina (*SLNP*) preparadas com o cisalhamento mecânico da suspensão tamponada em pH 7 de agregados de lignina; e b) micrografia de TEM das respectivas nanopartículas (*SLNP*).

É possível observar nas micrografias (Figura 25), que as nanopartículas apresentam formatos irregulares com grande polidispersão diferente das nanopartículas obtidas pelo método da adição de não-solvente (*LNP* e *AcLNP* – Figura 21). Este resultado é uma consequência do método de preparo *top-down* destas nanopartículas. Inicialmente, quando o licor básico é acidificado, as macromoléculas se agregam rapidamente formando estruturas que não passam por um mecanismo específico de organização e orientação das macromoléculas. Em seguida, quando o pH do meio dispersante é tamponado em 7, aumenta-se a quantidade de hidroxilas adsorvidas na superfície das nanopartículas, as quais são formadas com as altas tensões de cisalhamento.

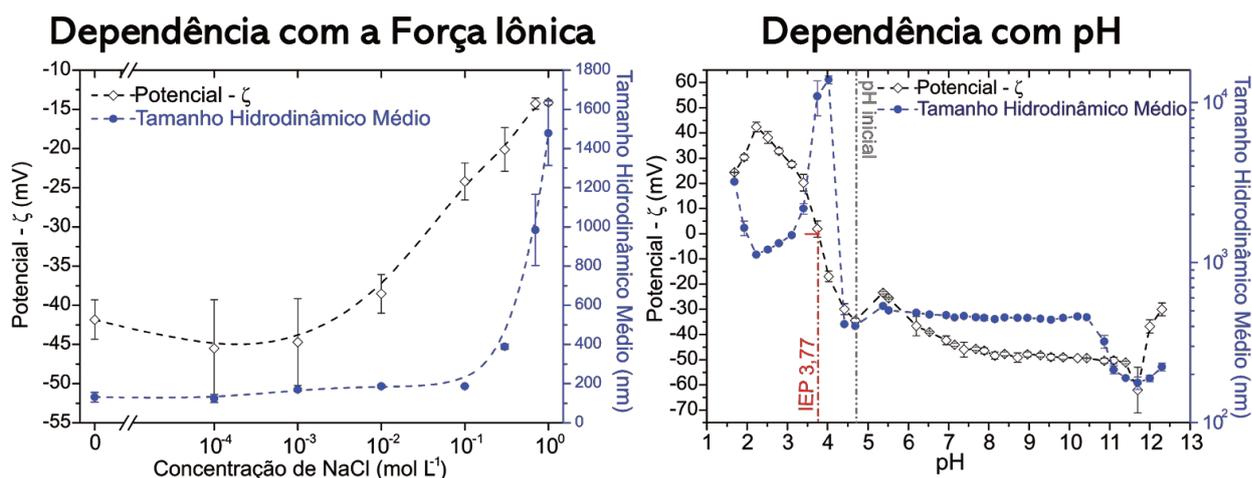
Na Figura 26 é apresentado o histograma da distribuição de tamanhos (maior diâmetro medido para cada partícula) das nanopartículas de lignina obtidas com o cisalhamento mecânico (*SLNP*) e comparação com a distribuição de tamanhos obtida para as *LNPs*, os perfis das distribuições de tamanhos são parecidos, salvo o fato das *SLNPs* apresentarem estruturas com tamanhos entre 160 e 220 nm. O diâmetro médio das *SLNPs* foi de  $(57 \pm 31)$  nm e a distribuição de tamanhos mostra que as nanopartículas são moderadamente dispersas.



**Figura 26.** Histograma da distribuição de tamanhos das nanopartículas (*SLNP*) obtidas com o cisalhamento mecânico e comparação com a distribuição de tamanhos das *LNPs*. Os diâmetros foram medidos manualmente (500 partículas foram contabilizadas) nas micrografias de FESEM utilizando o software ImageJ®. Os diâmetros mínimo e máximo contabilizados para as *SLNPs* foram 17 nm e 214 nm, respectivamente.

Como discutido anteriormente, a estabilidade das dispersões de nanopartículas de lignina em água é dependente do pH e da força iônica do meio dispersante pois, assim como as *LNPs* e *A<sub>CLNPs</sub>*, as *SLNPs* são estabilizadas por meio da ação de forças repulsivas entre as duplas camadas elétricas, que são estabelecidas em decorrência da adsorção de hidroxilas na superfície das nanopartículas e dissociação de ácidos carboxílicos.<sup>121,124</sup> Por esta razão, investigou-se também a estabilidade das *SLNPs* frente à variação do pH e da força iônica da suspensão.

O resultado, apresentado na *Figura 27*, mostra que a suspensão de *SLNPs* em água no pH=7 possui um potencial de, aproximadamente, -42 mV. Este potencial zeta é suficiente para estabilizar a suspensão de nanopartículas de acordo com a teoria DLVO.<sup>124</sup> Para o ensaio da dependência com o pH, que foi feito sem adição de tampão, também se observou que as nanopartículas são estáveis para valores de pH entre 4,5 e 11, sendo que o ponto isoelétrico (IEP) é de 3,77. Para valores inferiores ao IEP as nanopartículas são instáveis e formam agregados indicando a desestabilização do sistema.



**Figura 27.** Estudo da estabilidade das nanopartículas (*SLNP*) frente à variação da força iônica e do pH do meio dispersante. As *SLNPs* apresentaram ponto isoelétrico (IEP) no pH=3,77 e estabilidade para concentrações de NaCl inferiores a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e para valores de pH entre 4,5 e 11 ( $|\zeta| > 25 \text{ mV}$ ). O pH marcado como inicial é o pH da suspensão sem adição de tampão fosfato. Já para a investigação da força iônica o sistema foi tamponado em pH=7. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.

Com o aumento da força iônica do meio para  $0,1$  a suspensão de *SLNPs* também se mostrou instável visto que o potencial diminuiu para  $|-20 \text{ mV}|$ , aproximadamente (*Figura 27*). Para concentrações de NaCl maiores que  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  o potencial zeta diminui (em módulo) constantemente em toda faixa. Da mesma forma, o tamanho hidrodinâmico médio aumenta consideravelmente para valores de força iônica maiores que  $0,1$  – o que indica a agregação das partículas. As *SLNPs* são, portanto, 10 vezes mais resistentes ao aumento da força iônica do meio dispersante do que as nanopartículas obtidas com adição de não-solvente (*LNP* e *AcLNP*).

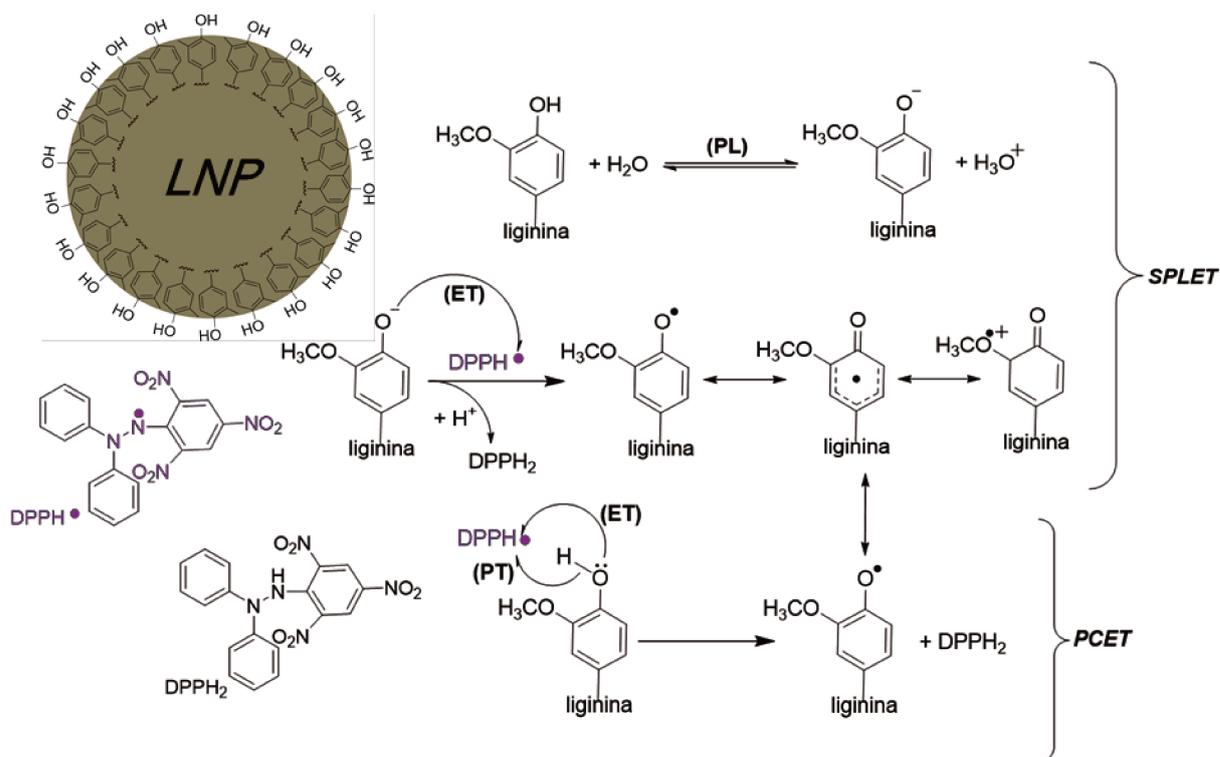
A quantidade de grupos ionizáveis na superfície das nanopartículas também foi determinada e o valor encontrado foi de  $(0,317 \pm 0,005) \text{ mmol g}^{-1}$ . Este resultando não é coerente com o esperado para as *SLNPs*, visto que o valor obtido foi, inclusive, inferior ao valor encontrado para a lignina *bulk* (*Tabela 5*). A técnica de titulação condutimétrica mostrou-se bastante reprodutível para a determinação da quantidade de hidroxilas superficiais nas nanopartículas (*LNP* e *AcLNP*), no entanto, como é necessária a adição de HCl no início, o pH ácido do meio levou a desestabilização das *SLNPs*. Isto não aconteceu para as *LNPs* e *AcLNPs*, pois o pH no início da titulação era superior ao ponto isoelétrico.

Assim, a quantificação dos grupos ionizáveis no caso das *SLNPs* está provavelmente resultando em um valor final que não é real.

A despeito desse resultado, é esperado que as *SLNPs* preparadas com a adição de tampão apresentem uma quantidade de hidroxilas superficiais semelhante ao valor encontrado para as *LNPs*, visto que no pH=7 as *SLNPs* são bastante estáveis. Por fim, todas as nanopartículas preparadas (*LNP*, *AcLNP* e *SLNP*) mostraram-se estáveis para a faixa de pH entre 5 e 7, que é tipicamente encontrada em produtos dermocosméticos.<sup>126</sup> Assim, é possível propor aqui a aplicação das nanopartículas de lignina em produtos dermocosméticos após os devidos ensaios clínicos.

### 4.3 Estudo da Atividade Antioxidante da Lignina em Solução e das Nanopartículas de Lignina

A atividade antioxidante da lignina está estritamente relacionada com sua estrutura molecular, como foi apresentado no trabalho de Dizhbite e colaboradores.<sup>109</sup> A presença de grupos fenólicos com substituintes metoxila em posição *orto* (guaiacil e siringil) reflete diretamente na capacidade de captura radicalar da lignina; já que estes grupos *orto* substituídos contribuem com a estabilização, por ressonância, dos radicais fenoxila formados no processo (*Figura 28*). Dentre os ensaios existentes para avaliar a atividade antioxidante de substâncias naturais, o método colorimétrico baseado na eliminação do radical- $\pi$  2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>) é, de longe, o mais utilizado.<sup>88</sup> Vários depuradores de radicais reagem com o DPPH<sup>\*</sup> transferindo-lhe um elétron e um próton, todavia, há dois mecanismos possíveis propostos para essa reação, como apresentado na *Figura 28*.



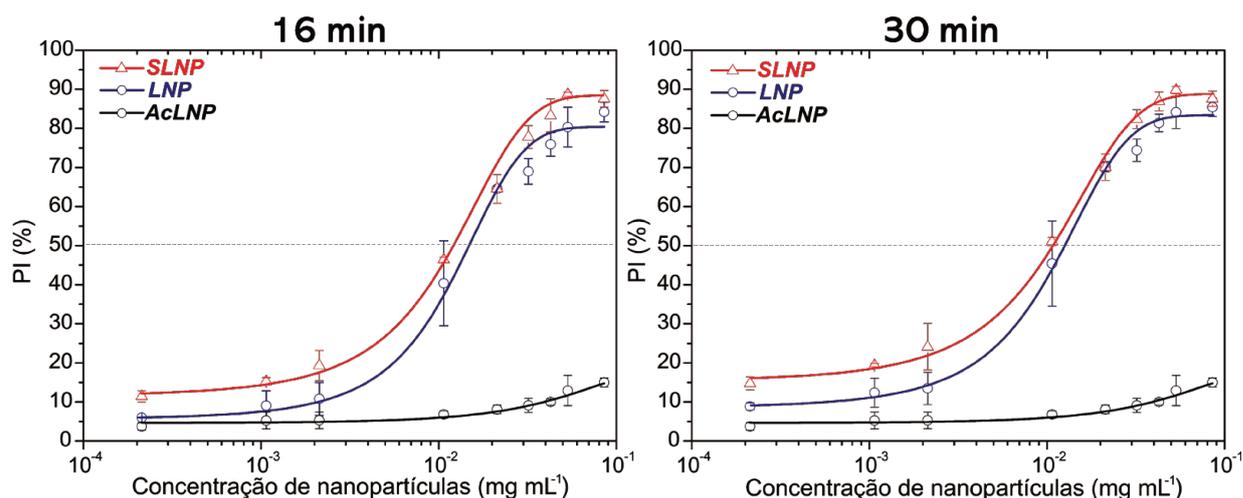
**Figura 28.** Representação esquemática dos possíveis mecanismos de captura do radical  $\text{DPPH}^\bullet$ : perda sequencial de próton e transferência de elétron **SPLET** (do inglês, *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*) e transferência acoplada de próton e elétron **PCET** (do inglês, *Proton-Coupled Electron Transfer*). O mecanismo **SPLET** pode prevalecer sobre o **PCET** em solventes polares ( $\text{H}_2\text{O}$ ) se o pH for básico. Em água e metanol, as fenoxilas da lignina estabelecem um equilíbrio de dissociação perdendo um próton (**PL**) levando à formação de ânions fenolatos. Esses ânions transferem um elétron (**ET**) para o radical  $\text{DPPH}^\bullet$  (cor púrpura) formando radicais fenoxila, que são estabilizados por ressonância. As espécies de  $\text{DPPH}_2$  (cor amarela) são formadas na captura de um próton. Se a dissociação não ocorrer, o grupo fenólico reage com o radical  $\text{DPPH}^\bullet$  por meio de um mecanismo com transferência acoplada de próton (**PT**) e elétron (**PCET**).

Como discutido por Foti, estes mecanismos dependem da natureza química dos solventes e de sua polaridade.<sup>127</sup> No caso dos solventes aplicados em nossos sistemas (metanol e água), que são polares, a reação de grupos fenólicos com o  $\text{DPPH}^\bullet$  pode ocorrer via uma única etapa (mecanismo acoplado de transferência de próton e elétron – **PCET**) ou via duas etapas (mecanismo sequencial de perda de próton e transferência de elétron – **SPLET**), como apresentado na *Figura 28*. Como as nanopartículas de lignina estão em água (pH neutro), as hidroxilas fenólicas não se encontram dissociadas na superfície; portanto, é possível inferir que o mecanismo acoplado de transferência de elétron para o radical  $\text{DPPH}^\bullet$  ocorre diretamente na superfície das nanopartículas (mecanismo **PCET**).

As atividades antioxidantes da lignina em solução e das nanopartículas de lignina foram investigadas seguindo o método de Brand-Williams – já bem estabelecido na literatura.<sup>94</sup> Assim, os resultados são apresentados aqui em termos do valor  $EC_{50}$  (concentração eficaz), que é definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH<sup>•</sup> em 50% e, em termos do índice de eliminação radicalar (RSI), que é definido como o inverso do  $EC_{50}$ . Estes parâmetros foram obtidos a partir dos gráficos (*Figuras 29 e 30*) da porcentagem de inibição radicalar (PI%) em função da concentração inicial das suspensões de nanopartículas (*LNP, AcLNP e SLNP* – *Figura 29*) e das soluções de lignina ou de acetado de lignina em dioxano (*Figura 30*) postas para reagir com o radical.

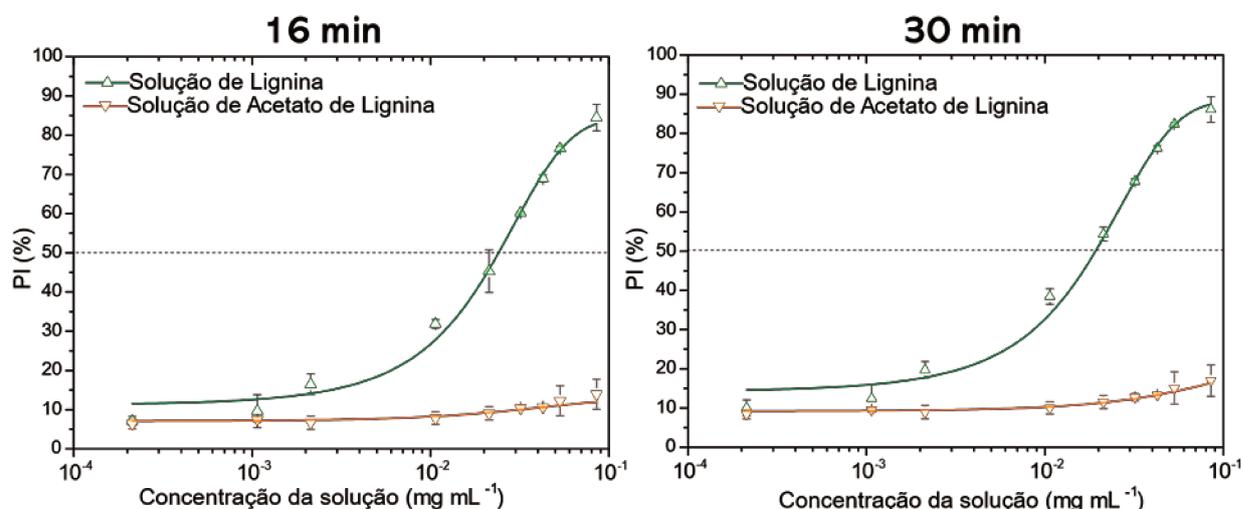
Os resultados apresentados na *Figura 29* mostram que, tanto as *SLNPs* como as *LNPs* apresentam maiores porcentagens de inibição radicalar do que as *AcLNPs*. Enquanto as *LNPs* e *SLNPs* apresentaram um percentual de inibição radicalar de 50% para uma concentração de, aproximadamente,  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ , as *AcLNPs* apresentaram um PI inferior a 10% para esta concentração. Este resultado já era esperado, visto que, nas *AcLNPs*, a maioria dos grupos fenólicos foram acetilados e, conseqüentemente, a quantidade de hidroxilas fenólicas disponíveis para reagir com o radical DPPH<sup>•</sup> foi reduzida.

Como apresentado anteriormente na *Tabela 5*, a concentração de ácidos fracos (hidroxilas fenólicas) na superfície das *AcLNPs* foi reduzida pela metade em comparação com as *LNPs*, um resultado que explica a considerável diminuição da atividade antioxidante das *AcLNPs*. Além do mais, esta observação experimental certifica que a atividade antioxidante das nanopartículas se dá em função da presença de hidroxilas fenólicas na superfície, como apresentado na *Figura 28*.



**Figura 29.** Representações gráficas dos percentuais de inibição radicalar (PI) em função da concentração inicial de nanopartículas de lignina (*SLNP*, *LNP* e *AcLNP*) que reagiram com o radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  em água. Os dados experimentais foram descritos pela função sigmóide SGompertz utilizando o software OriginLab®. Os percentuais de inibição foram calculados após 16 min e 30 min de reação. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas.

Avaliou-se também a atividade antioxidante da lignina e do acetato de lignina em solução de dioxano e, como apresentado na *Figura 30*, a solução de lignina também apresentou maior atividade antioxidante que a solução de acetato de lignina. Outro resultado bastante notável é que as nanopartículas de lignina (*LNP* e *SLNP*) apresentam, também, maior atividade antioxidante que a lignina em solução (*Tabela 6*).



**Figura 30.** Representações gráficas dos percentuais de inibição radicalar (PI) em função da concentração inicial das soluções de lignina e acetato de lignina em dioxano que reagiram com o radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$ . Os dados experimentais foram descritos pela função sigmóide SGompertz utilizando o software OriginLab®. Os percentuais de inibição foram calculados após 16 min e 30 min de reação. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas.

Uma possível explicação deste resultado é que a lignina em solução se organiza de modo a maximizar o número de interações intermoleculares com as moléculas do solvente e com outras moléculas de lignina. Nesta disposição, as hidroxilas aromáticas não se encontram tão facilmente acessíveis pelo radical DPPH\* quanto os fenóis na superfície das nanopartículas – que por estarem orientados reagem mais facilmente com o radical.

Estudou-se, também, como o tempo de reação impacta nas atividades antioxidantes e, como apresentado na *Tabela 6*, é possível inferir que não houve uma grande diferença entre os valores de RSI obtidos após 16 min e 30 min de reação. Estes tempos haviam sido escolhidos para as medidas com base nos resultados previamente reportados na literatura para a avaliação da atividade antioxidante da lignina.<sup>90</sup>

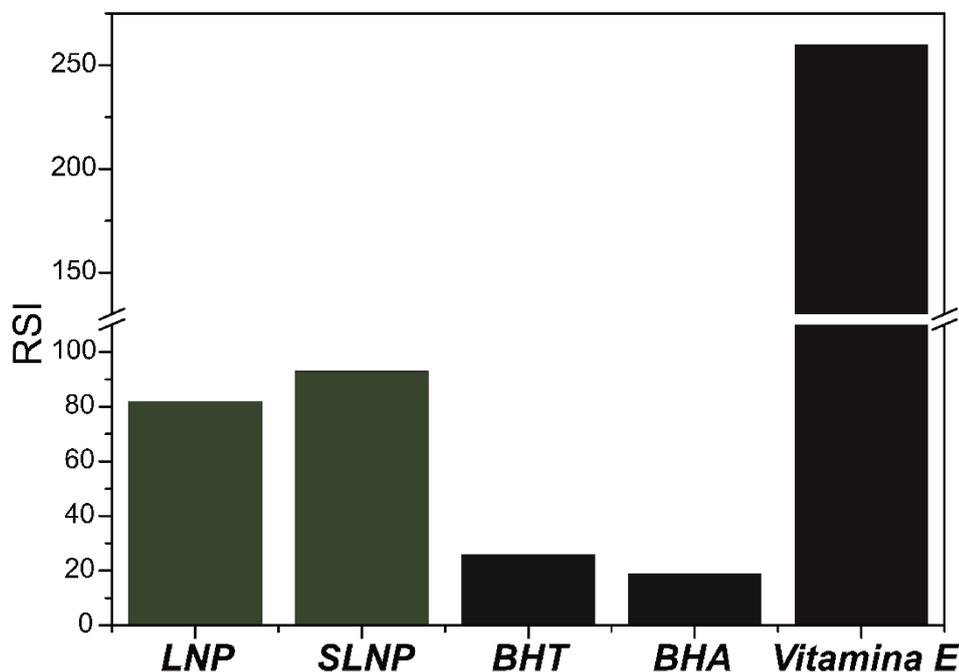
**Tabela 6.** Resultados da atividade antioxidante das nanopartículas (*LNP*, *SLNP* e *AcLNP*) e das soluções de lignina e de acetato de lignina para os tempos de reação de 16 min e 30 min. Os parâmetros da atividade antioxidante são a concentração eficaz para inibição radicalar de 50% ( $EC_{50}$ ) e o índice de eliminação radicalar (RSI).

	16 min		30 min	
	$EC_{50}(\text{mg mL}^{-1})$	RSI	$EC_{50}(\text{mg mL}^{-1})$	RSI
<b>Solução de Lignina</b>	$(0,024 \pm 0,001)$	$(42,5 \pm 0,7)$	$(0,020 \pm 0,004)$	$(51 \pm 11)$
<i>LNP</i>	$(0,015 \pm 0,002)$	$(69 \pm 10)$	$(0,012 \pm 0,002)$	$(82 \pm 13)$
<i>SLNP</i>	$(0,013 \pm 0,001)$	$(77 \pm 5)$	$(0,011 \pm 0,001)$	$(93 \pm 6)$
<b>Solução de Acetato de Lignina</b>	$(0,940 \pm 0,080)$	$(1,07 \pm 0,09)$	$(0,980 \pm 0,020)$	$(1,02 \pm 0,02)$
<i>AcLNP</i>	$(0,971 \pm 0,005)$	$(1,031 \pm 0,01)$	$(0,910 \pm 0,050)$	$(1,09 \pm 0,06)$

Nota: O  $EC_{50}$  e o RSI são inversamente proporcionais. Valores pequenos de  $EC_{50}$  refletem uma elevada atividade antioxidante.

As nanopartículas de lignina (*LNP* e *SLNP*) apresentaram valores de  $EC_{50}$  bastantes pequenos o que é um resultado muito promissor. Dentre os antioxidantes mais utilizados na indústria alimentícia e de dermocosméticos, o hidroxitolueno butilado BHT ( $EC_{50} = 0,038 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e o hidroxianisol butilado BHA ( $EC_{50} = 0,056 \text{ mg mL}^{-1}$ ) apresentam valores maiores de  $EC_{50}$ .<sup>128</sup> Consequentemente, é possível indicar aqui que as nanopartículas de lignina do capim elefante podem ser substitutas promissoras dos antioxidantes sintéticos utilizados hoje, visto que elas apresentam maior atividade

antioxidante. Na *Figura 31*, é apresentado uma comparação dos valores médios de RSI encontrados para as nanopartículas com os valores de RSI dos antioxidantes sintéticos aplicados na indústria e da vitamina E, que é uma molécula orgânica com atividade antioxidante bastante elevada.



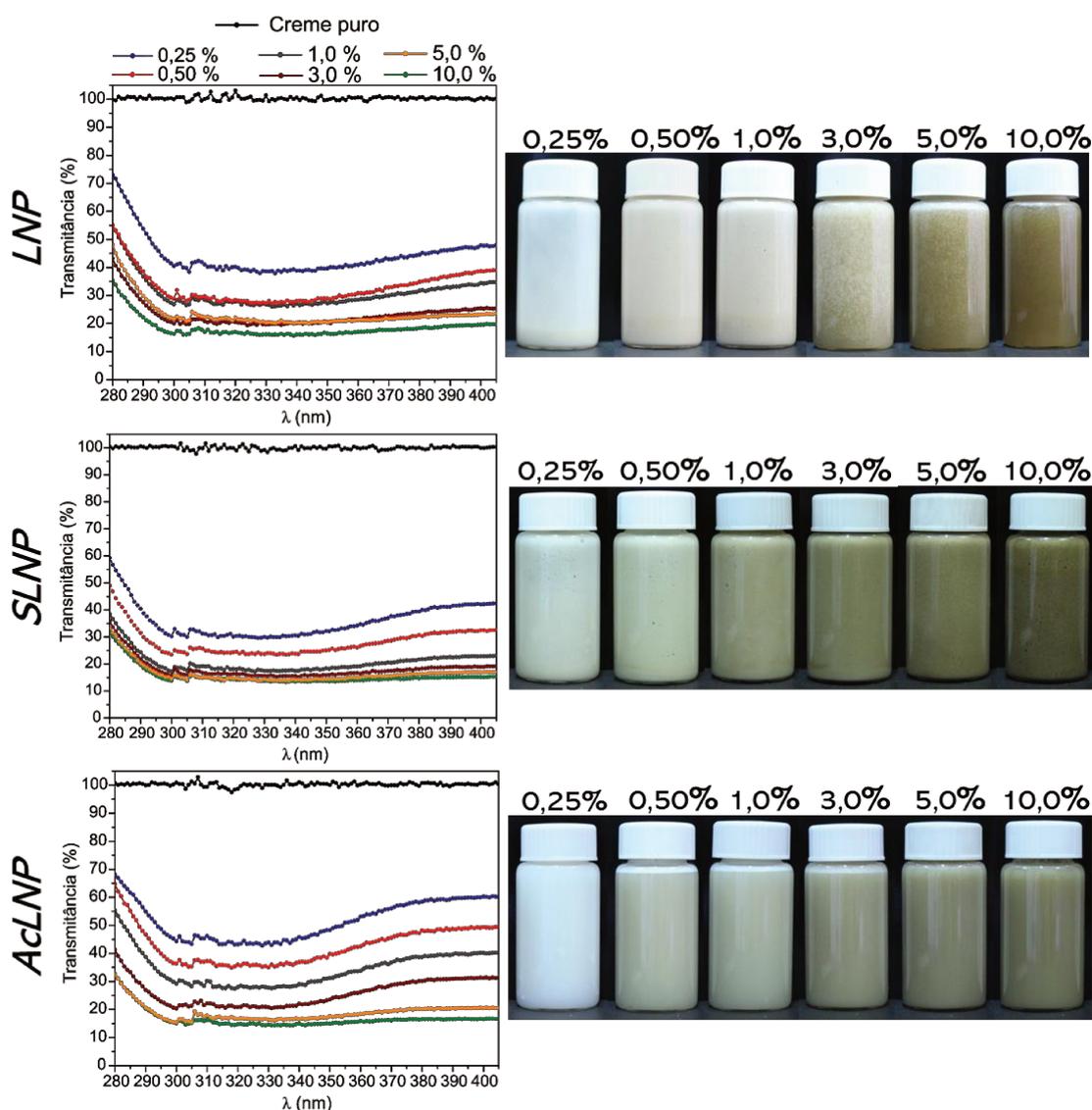
**Figura 31.** Comparação dos valores de RSI médios encontrados para a LNP e SLNP com valores reportados na literatura para os antioxidantes sintéticos (BHT e BHA) e para a vitamina E.<sup>90,128</sup>

Os valores de  $EC_{50}$  e RSI obtidos para a lignina em solução também foram comparados com valores reportados na literatura e foi possível concluir que a lignina do capim elefante apresenta elevada atividade antioxidante. Em um trabalho recente, Sharma e colaboradores<sup>129</sup> encontraram um valor de RSI de 2,63 ( $EC_{50} = 0,38 \text{ mg mL}^{-1}$ ) para solução de lignina extraída do bagaço de cana-de-açúcar via tratamento com NaOH. Portanto, é possível inferir que a lignina extraída do capim elefante pelo método apresentado aqui apresenta maior atividade antioxidante (RSI 30 vezes maior) que a lignina do bagaço reportada no trabalho anterior.

Por fim, é possível propor aqui o uso das nanopartículas de lignina em cremes dermocosméticos com atividade antioxidante, visto que elas apresentaram elevada atividade antioxidante e podem ser facilmente dispersadas em matrizes aquosas.

## 4.4 Estudo da Absorção UVA–UVB de Cremes com Nanopartículas de Lignina

Para testar a atuação das nanopartículas de lignina (*LNP*, *SLNP* e *ACLNP*) em filtros solares, as suspensões contendo cada uma das nanopartículas foram incorporadas em uma base de creme não-iônico, que é um veículo bastante utilizado no preparo de cosméticos e dermocosméticos. Medidas de transmitância na região do UV (280–400 nm) foram obtidas para formulações de fotoprotetores com concentrações percentuais crescentes de nanopartículas de lignina por massa de creme (% m/m), os resultados são apresentados na Figura 32.



**Figura 32.** Espectros de transmitância na região do UV da base de creme pura (branco) e com incorporação crescente de nanopartículas de lignina (*LNP*, *SLNP* e *ACLNP*). Ao lado direito, tem-se as imagens dos cremes fotoprotetores preparados com suas respectivas concentrações percentuais.

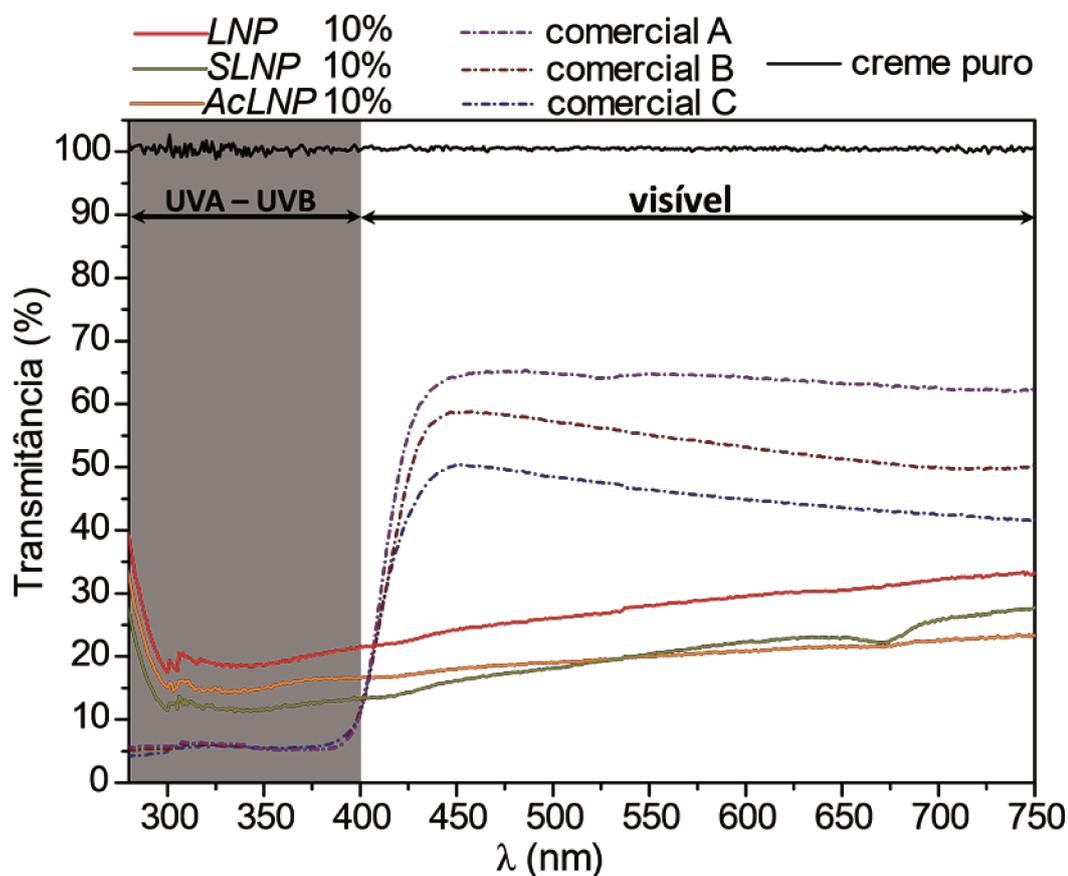
Em todos os casos, a incorporação de nanopartículas de lignina resultou na diminuição da transmitância da radiação UVA e UVB (290 – 400 nm) em comparação com a base de creme pura. Isto ocorre, pois a lignina apresenta grupos cromóforos que absorvem a radiação UV promovendo elétrons de orbitais HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) para orbitais LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia).<sup>41</sup>

Os grupos aromáticos presentes na estrutura da lignina apresentam múltiplas bandas de absorção  $\pi \rightarrow \pi^*$  com máximos na região de 280 – 340 nm do espectro ultravioleta. A presença de substituintes auxocromos no anel aromático, como as hidroxilas -OH e as metoxilas -OCH<sub>3</sub>, levam a um deslocamento batocrômico das bandas de absorção  $\pi \rightarrow \pi^*$  e, por isso, as nanopartículas de lignina absorvem em toda a região UVA e UVB do espectro.<sup>130,131</sup> Ademais, é possível propor também que parte da radiação incidente também é espalhada pelas nanopartículas resultando na diminuição da transmitância. Conseqüentemente, as nanopartículas de lignina apresentam-se como uma vantagem frente aos protetores comerciais, que tipicamente são preparados com a incorporação de mais de um princípio ativo para garantir absorção em toda a região UVA – UVB do espectro.<sup>132</sup>

Como apresentado na *Figura 32*, o aumento na porcentagem de nanopartículas no creme leva a uma diminuição da transmitância (aumento da absorção e espalhamento UV). Paralelamente, observa-se um aumento da tonalidade das emulsões preparadas, o que é um resultado promissor visto que, atualmente, buscam-se protetores solares coloridos que absorvam também radiação visível.<sup>133</sup> Como apresentado por Tonolli<sup>134</sup> e colaboradores, a radiação visível também é responsável pelo dano de células do tecido epitelial e este dano é bastante acentuado em combinação com os efeitos de sensibilização dos queratinócitos pela radiação UVA.

Contudo, os fotoprotetores convencionais, tipicamente, não bloqueiam a radiação visível (400 – 750 nm). Na *Figura 33*, é apresentado o espectro de transmissão de UV-vis de três protetores comerciais com FPS 30, observa-se que na região do visível aproximadamente metade da radiação é transmitida. Já os cremes com 10% em massa de

nanopartículas de lignina transmitem menos de 35% da radiação visível. Este resultado indica que as nanopartículas também têm potencial para serem aplicadas como filtros da radiação visível.



**Figura 33.** Espectro de transmitância na região do UVA – UVB (290 – 400 nm) e do visível (400 – 750 nm) de protetores comerciais (A, B e C de FPS 30) e dos cremes com incorporação de 10% (m/m) de nanopartículas de lignina (*LNP*, *SLNP* e *AcLNP*). A base de creme puro foi utilizada como branco.

O fator de proteção solar (FPS) dos protetores tem por definição a razão numérica entre a Dose Eritematosa Mínima (DEM) da pele com a aplicação de uma fina camada de creme protetor ( $2,0 \text{ mg cm}^{-2}$ ) e a Dose Eritematosa Mínima da pele não protegida ( $DEM_{np}$ ), como indicado na Equação 6.<sup>135</sup>

$$FPS = \frac{DEM}{DEM_{np}} \quad \text{Eq. 6}$$

A determinação das doses eritematosas é feita com testes *in vivo*, por meio da irradiação da pele de voluntários com doses progressivamente crescentes de radiação

UVA-UVB geradas por um simulador solar. O eritema na pele dos voluntários é avaliado após 16 a 24 horas de exposição à radiação UV.

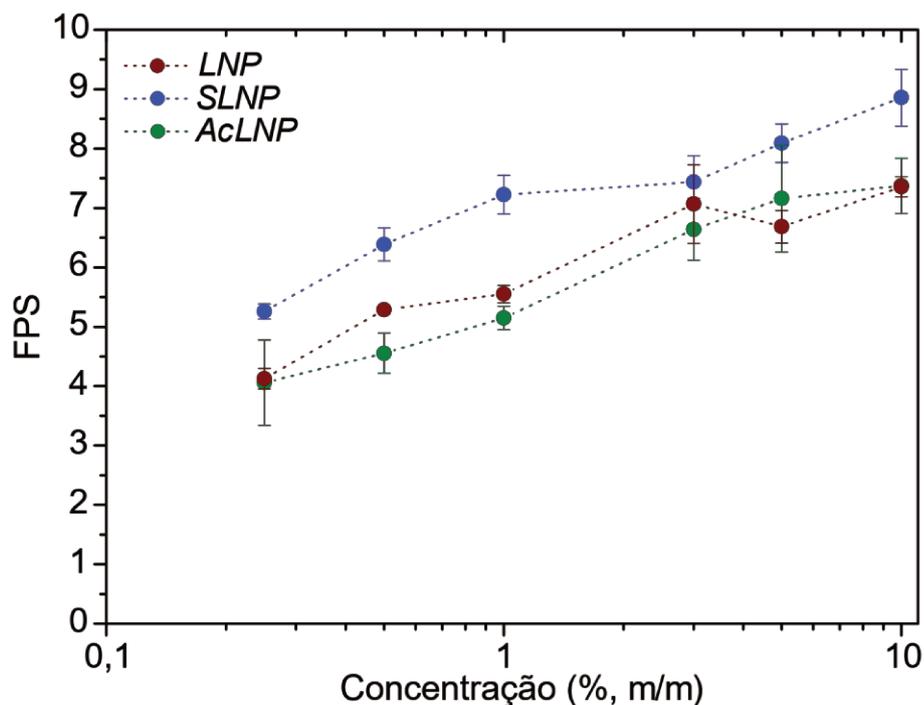
O método *in vivo* para determinação do FPS de protetores solares é normatizado pela agência estado-unidense FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e pela associação europeia COLIPA (do francês, *Comité de Liason des Associations Européenes de l'Industrie de la Parfumerie*) e é conhecido por método ISPF (do inglês, *International Sun Protection Factor Test Method*). No entanto, metodologias *in vitro* para determinação do FPS também são realizadas para investigação inicial da aplicabilidade de substâncias fotoprotetoras em dermocosméticos, apesar dessas metodologias não serem normatizadas.<sup>111,135</sup>

Há dois tipos de métodos *in vitro* que são aplicados para investigação exploratória da ação fotoprotetora de substâncias: 1) métodos diretos, que envolvem medidas de absorção/transmissão da radiação UV por espectroscopia de refletância difusa ou 2) métodos indiretos, em que a molécula fotoprotetora presente nos cremes é extraída e solubilizada em álcoois e, posteriormente, a absorção da solução é medida.<sup>88,135</sup> Em ambos os casos, o FPS é determinado a partir do somatório da multiplicação dos parâmetros efetividade espectral eritematosa ( $E_{\lambda}$ ) e irradiância solar espectral ( $S_{\lambda}$ ) para cada comprimento de onda e respectivo valor de absorção, como apresentado na parte experimental no item 3.2.6.

Na *Figura 34*, tem-se os valores de FPS calculados para as amostras de cremes com incorporação crescente (% m/m) das nanopartículas de lignina (*LNP*, *SLNP* e *AcLNP*). Em todos os casos, obteve-se valores de FPS de baixa proteção, sabendo-se que o fator de protetor solar dos protetores é classificado em quatro categorias: baixa proteção (FPS de 6 a 10), média proteção (FPS de 15 a 25), alta proteção (FPS de 30 a 50) e elevada proteção (FPS superiores a 50).<sup>132</sup>

O creme com incorporação de *SLNP* apresentou FPS superior a 6 para concentrações maiores que 0,5% (m/m), já os cremes preparados com incorporação das nanopartículas *LNP* e *AcLNP* apresentaram FPS superior a 6 para concentrações maiores que 3% (*Figura 34*). Este resultado pode ser associado à distribuição de tamanhos das

nanopartículas preparadas, visto que as *SLNPs* apresentaram distribuição de tamanhos inferiores (*Figura 26*) e, portanto, apresentam maior área superficial exposta. No entanto, considerando o desvio padrão das medidas, é possível inferir que não houve diferenças muito significativas entre os valores de FPS obtidos para as três amostras e todas apresentaram a tendência de aumento do FPS com o aumento da concentração de nanopartículas incorporadas.



**Figura 34.** Valores de FPS determinados a partir dos espectros de transmitância em função da concentração percentual de nanopartículas de lignina (*LNP*, *SLNP* e *AcLNP*) incorporadas no creme não-iônico. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.

O FPS dos cremes comerciais (rotulados com FPS 30) também foram determinados pelo método *in vitro* (*Figura 33*) visando a comparação com os valores de FPS obtidos para os cremes com incorporação das nanopartículas. Os valores encontrados foram **12,3**; **12,6** e **12,7** para os protetores comerciais A, B e C, respectivamente. Estes valores são, em média, 2,40 vezes menores que os valores rotulados (determinados pela metodologia *in vivo*, provavelmente).

Portanto, multiplicando os valores de FPS obtidos pelo método *in vitro* por 2,40 é possível estimar de forma simplificada quais seriam os valores de FPS obtidos pelo método *in vivo* dos cremes preparados neste trabalho (*Tabela 7*). A estimativa dos valores

de FPS multiplicados pelo fator permite inferir que os protetores preparados com a incorporação das nanopartículas apresentariam valores de FPS *in vivo* de baixa a média proteção.

**Tabela 7.** Estimativa dos valores de FPS multiplicados pelo fator 2,40 para os três cremes preparados com incorporação crescente (em porcentagem) das nanopartículas (*LNP*, *SLNP* e *AcLNP*).

Creme	FPS x 2,40					
	0,25 %	0,50 %	1,0 %	3,0 %	5,0 %	10,0 %
<i>LNP</i>	(9,9 ± 0,4)	(12,7 ± 0,1)	(13,3 ± 0,4)	(17 ± 1)	(16,0 ± 0,7)	(17,7 ± 0,4)
<i>SLNP</i>	(12,6 ± 0,3)	(15,3 ± 0,7)	(17,3 ± 0,8)	(18 ± 1)	(19,4 ± 0,8)	(21 ± 1)
<i>AcLNP</i>	(9 ± 2)	(10,9 ± 0,8)	(12,4 ± 0,5)	(16 ± 1)	(17 ± 2)	(17 ± 1)

Por fim, é possível propor a aplicação das nanopartículas de lignina em produtos dermocosméticos com ação fotoprotetora frente à radiação UVA–UVB e visível. Dentre as nanopartículas preparadas, as melhores candidatas são as *LNPs* e *SLNPs* visto que, além da ação fotoprotetora, elas também apresentaram elevada atividade antioxidante, como discutido na seção 4.3. A atividade antioxidante também é importante para os filtros solares, que tipicamente contêm substâncias antioxidantes adicionadas em suas formulações. Visto que a radiação UV também leva à formação de radicais livres na pele que podem causar danos como envelhecimento da pele, escurecimento, carcinomas e melanomas.<sup>131</sup>

## 5. Conclusões

O tratamento em duas etapas, aplicado para fracionar a lignina do capim elefante, mostrou-se eficiente e direto. Adicionalmente, observou-se que a etapa básica do tratamento não levou a uma grande fragmentação das ligações éter arílicas da lignina. Contudo, o tratamento em condições brandas, ainda assim, resultou na quebra suficiente de ligações  $\beta$ -O-4; formando grandes quantidades de hidroxilas fenólicas ( $3,85 \text{ mmol g}^{-1}$ ), que têm papel fundamental na atividade antioxidante da lignina. Conjuntamente, as técnicas de RMN permitiram identificar que a lignina isolada do capim elefante pertence ao grupo de ligninas que possuem as três unidades poliméricas: *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S).

Associado a estes resultados, foi possível utilizar a lignina do capim elefante e seu produto acetilado para preparar nanopartículas esféricas de lignina e/ou nanopartículas ocas (no caso das *LNPs*) pela auto-organização das macromoléculas induzida pela adição de água como não-solvente. Além disso, nanopartículas de formato irregular foram obtidas pelo cisalhamento mecânico de agregados maiores de lignina (*SLNPs*). As nanopartículas obtidas apresentaram-se estáveis em uma ampla faixa de pH (5 – 11) e em força iônica inferior a 0,01 para as *LNPs* e *AcLNPs* e 0,1 para as *SLNPs*.

O resultado promissor deste trabalho foi a marcante atividade antioxidante apresentada pelas nanopartículas de lignina (*LNP* e *SLNP*) em suspensão aquosa, sendo que o menor  $EC_{50}$  encontrado foi de  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ . Esse valor equivale a um RSI quatro vezes maior que os reportados na literatura para o antioxidante sintético BHT ( $EC_{50}=0,038 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e cinco vezes maior que o BHA ( $EC_{50}=0,056 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Os cremes em que foram incorporadas nanopartículas de lignina apresentaram proteção frente à radiação UVA – UVB e visível, sendo os valores de FPS superiores a 6 para concentrações de *SLNP* de 0,5% (m/m) e de *LNP* e *AcLNP* de 3,0 % (m/m). Assim, é possível propor a utilização das nanopartículas de lignina para aplicação em cremes dermocosméticos, em vista da biocompatibilidade e biodegradabilidade da lignina, já reportada na literatura.

## 6. Referências

1. Brundtland, G. H.; Our Common Future: Report of the World Commission on Environment and Development. United Nations, **1987**
2. Hurmekoski, E., Lovrić, M., Lovrić, N., Hetemäki, L. & Winkel, G. Frontiers of the forest-based bioeconomy – A European Delphi study. *For. Policy Econ.* 102, 86–99, **2019**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2019.03.008>
3. Meeting Policy Challenges for a Sustainable Bioeconomy, OECD Publishing, Paris, **2018**. doi: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264292345-en>
4. Sillanpää, M. & Ncibi, C. Bioeconomy: The Path to Sustainability. in *A Sustainable Bioeconomy* 29–53, Springer International Publishing, **2017**. doi:10.1007/978-3-319-55637-6\_2
5. Vivien, F.-D., Nieddu, M., Befort, N., Debref, R. & Giampietro, M. The Hijacking of the Bioeconomy. *Ecol. Econ.* 159, 189–197, **2019**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2019.01.027>
6. International Energy Agency, Brochure IAE Bioenergy Task 42 Biorefinery. Disponível em: <https://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/en/ieabiorefinery.htm> (Acessado dia 27/03/2019)
7. Ragauskas, A. J. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* 311, 484–489, **2006**. doi: 10.1126/science.1114736
8. Alonso, D. M. *et al.* Increasing the revenue from lignocellulosic biomass: Maximizing feedstock utilization. *Sci. Adv.* 3, e1603301, **2017**. doi: 10.1126/sciadv.1603301
9. World Oil Outlook 2040, Organization of the Petroleum Exporting Countries. 2017 OPEC World Oil Outlook, **2017**. Disponível em: <http://www.opec.org> (Acessado dia 03/04/2019)

- 10.** Costa, M., Silva, C. A. M., Ferreira, A. F. & Rabaçal, M. *Biorefineries. Targeting Energy, High Value Products and Waste Valorisation*. 57, Springer Berlin Heidelberg, ISSN 2195-1292, ISBN 978-3-319-48286-6, **2017**. doi: 10.1007/978-3-319-48288-0
- 11.** Jong, Ed., Higson, A., Walsh, P., Wellisch, M., Bio-based Chemicals Values Added Products from Biorefineries, IEA Bioenergy-Task 42. Disponível em: [www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com](http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com) (Acessado dia 03/04/2019)
- 12.** Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R. & Iqbal, H. M. N. Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 99, 308–318, **2017**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.097>
- 13.** Foster, E. J. *et al.* Current characterization methods for cellulose nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 47, 2609–2679, **2018**. doi: 10.1039/c6cs00895j
- 14.** Ragauskas, A. J. *et al.* Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science* 344, 1246843–1246843, **2014**. doi: 10.1126/science.1246843
- 15.** Schutyser, W. *et al.* Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chem. Soc. Rev.* 47, 852–908, **2018**. doi: 10.1039/c7cs00566k
- 16.** Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S. C. & Long, S. P. Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. *Science* 329, 790–792, **2010**.doi: 10.1126/science.1189268
- 17.** Limayem, A. & Ricke, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 449–467, **2012**. doi:10.1016/j.pecs.2012.03.002
- 18.** Himmel, M. E. *et al.* Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807, **2007**. doi: 10.1126/science.1137016
- 19.** Figueiredo, P., Lintinen, K., Hirvonen, J. T., Kostianen, M. A. & Santos, H. A. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for

biomedical applications. *Prog. Mater. Sci.* 93, 233–269, **2018**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.12.001>

**20.** Rezende, C. A. *et al.* Optimization of biomass pretreatments using fractional factorial experimental design. *Biotechnol. Biofuels* 11, 206, **2018**. doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1200-2>

**21.** Lima, M. A. *et al.* Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production, 19, **2014**. doi:10.1186/1754-6834-7-10

**22.** Nascimento, S. A. & Rezende, C. A. Combined approaches to obtain cellulose nanocrystals, nanofibrils and fermentable sugars from elephant grass. *Carbohydr. Polym.* 180, 38–45, **2018**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.099>

**23.** Toscan, A. *et al.* Effective Extraction of Lignin from Elephant Grass Using Imidazole and Its Effect on Enzymatic Saccharification To Produce Fermentable Sugars. *Ind. Eng. Chem. Res.* 56, 5138–5145, **2017**. doi: 10.1021/acs.iecr.6b04932

**24.** Heldt, H.-W., Piechulla, B. & Heldt, F. *Plant biochemistry*. Elsevier Acad. Press, 4, **2011**. ISBN : 978-0-12-384986-1

**25.** Dufresne, A. & Belgacem, M. N. Cellulose-reinforced composites: From micro-to nanoscale. *Polímeros.* 23, 277–286, **2013**. doi: <http://dx.doi.org/10.4322/polimeros.2010.01.001>

**26.** Ribeiro, G. O., Gruninger, R. J., Badhan, A. & McAllister, T. A. Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. *Anim. Front.* 6, 20–26, **2016**. doi:10.2527/af.2016-0019

**27.** Fang, Z., Smith, R. L. *Production of biofuels and chemicals from lignin*. Biofuels and Biorefineries 6, 3 - 24, Springer, **2016**. ISBN 978-981-10-1964-7, doi: 10.1007/978-981-10-1965-4

- 28.** Laurichesse, S. & Avérous, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Prog. Polym. Sci.* 39, 1266–1290, **2014**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004>
- 29.** Strassberger, Z., Tanase, S. & Rothenberg, G. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Adv* 4, 25310–25318, **2014**. doi: 10.1039/c4ra04747h
- 30.** Aro, T. & Fatehi, P. Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. *ChemSusChem* 10, 1861–1877, **2017**. doi: 10.1002/cssc.201700082
- 31.** Stewart, D. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Ind. Crops Prod.* 27, 202–207, **2008**. doi: 10.1016/j.indcrop.2007.07.008
- 32.** Kai, D. *et al.* Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chem.* 18, 1175–1200, **2016**. doi: 10.1039/c5gc02616d
- 33.** Li, K. Formaldehyde-free lignocellulosic adhesives and composites made from the adhesives. Beneficiário: State of Oregon Acting by and through the Oregon State Board of Higher Education on Behalf of Oregon State University (Corvallis, OR, US). Número da patente: 7252735. Data da edição: **2007-08-07**
- 34.** Adam, G. A. Lignin-based surfactants. Beneficiário: Empire Technology Development LLC. Número da patente: US20150158898A1. Data da edição: **2015-06-11**
- 35.** Ahvazi, B., Cloutier, É., Wojciechowicz, O. & Ngo, T.-D. Lignin Profiling: A Guide for Selecting Appropriate Lignins as Precursors in Biomaterials Development. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 5090–5105, **2016**. doi: 10.1021/acssuschemeng.6b00873
- 36.** Doherty, W. O. S., Mousavioun, P. & Fellows, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind. Crops Prod.* 33, 259–276, **2011**. doi:10.1016/j.indcrop.2010.10.022

- 37.** Glasser, W. G. & Sarkanen, S. *Lignin Properties and Materials*. American Chemical Society, 2-11, **1989**. ISBN 0-8412-1631-2
- 38.** Goring, D. A. I. The Lignin Paradigm. in *Lignin Properties and Materials*. American Chemical Society, 2-7, **1989**. ISBN 0-8412-1631-2
- 39.** Faulon, J.-L. & Hatcher, P. G. Is There Any Order in the Structure of Lignin? *Energy Fuels* 8, 402–407, **1994**. doi: 10.1021/ef00044a018
- 40.** Mahmood, Z. *et al.* Lignin as Natural Antioxidant Capacity. in *Lignin - Trends and Applications*, InTech, Chapter 8, **2018**. doi:10.5772/intechopen.73284
- 41.** Qian, Y., Qiu, X. & Zhu, S. Lignin: a nature-inspired sun blocker for broad-spectrum sunscreens. *Green Chem.* 17, 320–324, **2015**. doi: 10.1039/c4gc01333f
- 42.** Schoenherr, S., Ebrahimi, M. & Czermak, P. Lignin Degradation Processes and the Purification of Valuable Products. in *Lignin - Trends and Applications*. InTech, **2018**. doi:10.5772/intechopen.71210
- 43.** Schutyser, W. *et al.* Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chem. Soc. Rev.* 47, 852–908, **2018**. doi: 10.1039/c7cs00566k
- 44.** Nitsos, C. *et al.* Isolation and Characterization of Organosolv and Alkaline Lignins from Hardwood and Softwood Biomass. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 5181–5193, **2016**. doi: 10.1021/acssuschemeng.6b01205
- 45.** TOPIC: (lignin extraction) Refined by: TOPIC: (lignin nanoparticles) Citation report of Web of Science. (2019). Disponível em: [https://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search\\_mode=CitationReport&SID=E6ceCmSRnmdSvlinzPH&page=1&cr\\_pqid=2&viewType=summary&colName=WOS](https://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=E6ceCmSRnmdSvlinzPH&page=1&cr_pqid=2&viewType=summary&colName=WOS). (Acessado dia: 5/05/2019)
- 46.** Gellerstedt, G. Softwood kraft lignin: Raw material for the future. *Ind. Crops Prod.* 77, 845–854, **2015**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.040>

- 47.** Fache, M., Boutevin, B. & Caillol, S. Vanillin Production from Lignin and Its Use as a Renewable Chemical. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 35–46, **2016**. doi: 10.1021/acssuschemeng.5b01344
- 48.** Vanillin. Disponível em: <https://www.borregaard.com/Business-Areas/Borregaard-Ingredients/Vanillin>. (Acessado dia: 22/04/2019)
- 49.** Bomgardner, M. M. The problem with vanilla. **2016**. Disponível em: <https://cen.acs.org/articles/94/i36/problem-vanilla.html>. (Acessado dia: 5/04/2019)
- 50.** Gallage, N. J. *et al.* Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. *Nat. Commun.* 5, 4037, **2014**. doi: 10.1038/ncomms5037
- 51.** Deuss, P. J., Barta, K. & de Vries, J. G. Homogeneous catalysis for the conversion of biomass and biomass-derived platform chemicals. *Catal Sci Technol* 4, 1174–1196, **2014**. doi: 10.1039/c3cy01058a
- 52.** Future Use of Lignin in Value Added Products- A roadmap for possible Nordic/Baltic Innovation. *LigniMatch*, **2018**. <https://www.chalmers.se/en/projects/Pages/Lignimatch-Lignin-products.aspx>. Acessado dia: 2/05/2019
- 53.** Saito, T. *et al.* Development of lignin-based polyurethane thermoplastics. *RSC Adv.* 3, 21832, **2013**. doi: 10.1039/c3ra44794d
- 54.** Chung, Y.-L. *et al.* A Renewable Lignin–Lactide Copolymer and Application in Biobased Composites. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1, 1231–1238, **2013**. doi: dx.doi.org/10.1021/sc4000835
- 55.** Zhao, W., Simmons, B., Singh, S., Ragauskas, A. & Cheng, G. From lignin association to nano-/micro-particle preparation: extracting higher value of lignin. *Green Chem.* 18, 5693–5700, **2016**. doi: 10.1039/c6gc01813k
- 56.** Richter, A. P. *et al.* Synthesis and Characterization of Biodegradable Lignin Nanoparticles with Tunable Surface Properties. *Langmuir* 32, 6468–6477, **2016**. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b01088

- 57.** Lievonen, M. *et al.* A simple process for lignin nanoparticle preparation. *Green Chem.* 18, 1416–1422, **2016**. doi: 10.1039/c5gc01436k
- 58.** Dai, L., Liu, R., Hu, L.-Q., Zou, Z.-F. & Si, C.-L. Lignin Nanoparticle as a Novel Green Carrier for the Efficient Delivery of Resveratrol. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 8241–8249, **2017**. doi:10.1021/acssuschemeng.7b01903
- 59.** Kai, D. *et al.* Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chem.* 18, 1175–1200, **2016**. doi: 10.1039/c5gc02616d
- 60.** Garcia Gonzalez, M. N., Levi, M., Turri, S. & Griffini, G. Lignin nanoparticles by ultrasonication and their incorporation in waterborne polymer nanocomposites: ARTICLE. *J. Appl. Polym. Sci.* 134, 45318, **2017**. doi: 10.1002/app.45318
- 61.** Gilca, I. A., Popa, V. I. & Crestini, C. Obtaining lignin nanoparticles by sonication. *Ultrason. Sonochem.* 23, 369–375, **2015**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.021>
- 62.** Nair, S. S. *et al.* High Shear Homogenization of Lignin to Nanolignin and Thermal Stability of Nanolignin-Polyvinyl Alcohol Blends. *ChemSusChem* 7, 3513–3520, **2014**. doi: 10.1002/cssc.201402314
- 63.** Lu, Q. *et al.* Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin. *Food Chem.* 135, 63–67, **2012**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.070>
- 64.** Wang, B., Sun, D., Wang, H.-M., Yuan, T.-Q. & Sun, R.-C. Green and Facile Preparation of Regular Lignin Nanoparticles with High Yield and Their Natural Broad-Spectrum Sunscreens. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 2658–2666, **2019**. doi: 10.1021/acssuschemeng.8b05735
- 65.** Ten, E. *et al.* Lignin Nanotubes As Vehicles for Gene Delivery into Human Cells. *Biomacromolecules* 15, 327–338, **2014**. doi: [dx.doi.org/10.1021/bm401555p](http://dx.doi.org/10.1021/bm401555p)

- 66.** Richter, A. P. *et al.* An environmentally benign antimicrobial nanoparticle based on a silver-infused lignin core. *Nat. Nanotechnol.* 10, 817–823, **2015**. doi: 10.1038/NNANO.2015.141
- 67.** Gupta, A. K., Mohanty, S. & Nayak, S. K. Influence of addition of vapor grown carbon fibers on mechanical, thermal and biodegradation properties of lignin nanoparticle filled bio-poly(trimethylene terephthalate) hybrid nanocomposites. *RSC Adv.* 5, 56028–56036, **2015**. doi: 10.1039/c5ra07828h
- 68.** Yearla, S. R. & Padmasree, K. Preparation and characterisation of lignin nanoparticles: evaluation of their potential as antioxidants and UV protectants. *Journal of Experimental Nanoscience*, Taylor and Francis, 1:4, 289-302, **2015**. doi:10.1080/17458080.2015.1055842
- 69.** Chen, L. *et al.* Green synthesis of lignin nanoparticle in aqueous hydrotropic solution toward broadening the window for its processing and application. *Chem. Eng. J.* 346, 217–225, **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.020>
- 70.** Yang, W. *et al.* Valorization of Acid Isolated High Yield Lignin Nanoparticles as Innovative Antioxidant/Antimicrobial Organic Materials. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 13, **2018**. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b03782
- 71.** Sipponen, M. H., Smyth, M., Leskinen, T., Johansson, L.-S. & Österberg, M. All-lignin approach to prepare cationic colloidal lignin particles: stabilization of durable Pickering emulsions. *Green Chem.* 19, 5831–5840, **2017**. doi: 10.1039/c7gc02900d
- 72.** Richter, A. P. *et al.* Synthesis and Characterization of Biodegradable Lignin Nanoparticles with Tunable Surface Properties. Supplemental Information. *Langmuir* 32, 6468–6477, **2016**. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b01088
- 73.** Frangville, C. *et al.* Fabrication of Environmentally Biodegradable Lignin Nanoparticles. *ChemPhysChem* 13, 4235–4243, **2012**. doi: 10.1002/cphc.201200537

- 74.** Dai, L., Liu, R., Hu, L.-Q., Zou, Z.-F. & Si, C.-L. Lignin Nanoparticle as a Novel Green Carrier for the Efficient Delivery of Resveratrol. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 8241–8249, **2017**. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b01903
- 75.** Qian, Y., Deng, Y., Qiu, X., Li, H. & Yang, D. Formation of uniform colloidal spheres from lignin, a renewable resource recovered from pulping spent liquor. *Green Chem.* 16, 2156, **2014**. doi: 10.1039/c3gc42131g
- 76.** Xiong, F. *et al.* Preparation and Formation Mechanism of Renewable Lignin Hollow Nanospheres with a Single Hole by Self-Assembly. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 2273–2281, **2017**. doi: 10.1021/acssuschemeng.6b02585
- 77.** Tian, D. *et al.* Lignin valorization: lignin nanoparticles as high-value bio-additive for multifunctional nanocomposites. *Biotechnol. Biofuels* 10, 192, **2017**. doi: 10.1186/s13068-017-0876-z
- 78.** Qian, Y. *et al.* Lignin Reverse Micelles for UV-Absorbing and High Mechanical Performance Thermoplastics. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54, 12025–12030, **2015**. doi: 10.1021/acs.iecr.5b03360
- 79.** Li, H. *et al.* Preparation of Nanocapsules via the Self-Assembly of Kraft Lignin: A Totally Green Process with Renewable Resources. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 1946–1953, **2016**. doi: 10.1021/acssuschemeng.5b01066
- 80.** Myint, A. A. *et al.* One pot synthesis of environmentally friendly lignin nanoparticles with compressed liquid carbon dioxide as an antisolvent. *Green Chem.* 18, 2129–2146, **2016**. doi: 10.1039/c5gc02398j
- 81.** Juikar, S. J. & Vigneshwaran, N. Extraction of nanolignin from coconut fibers by controlled microbial hydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 109, 420–425, **2017**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.067>
- 82.** Tortora, M. *et al.* Ultrasound Driven Assembly of Lignin into Microcapsules for Storage and Delivery of Hydrophobic Molecules. *Biomacromolecules* 15, 1634–1643, **2014**. doi: [dx.doi.org/10.1021/bm500015j](http://dx.doi.org/10.1021/bm500015j)

- 83.** Yin, H. *et al.* A novel flocculant prepared by lignin nanoparticles-gelatin complex from switchgrass for the capture of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 545, 51–59, **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.02.033>
- 84.** Matsakas, L., Karnaouri, A., Cwirzen, A., Rova, U. & Christakopoulos, P. Formation of Lignin Nanoparticles by Combining Organosolv Pretreatment of Birch Biomass and Homogenization Processes. *Molecules* 23, 1822, **2018**. doi:10.3390/molecules23071822
- 85.** Wurm, F., Landfester, K., YIAMSAWAS, D., Thines, E. & Fischer, J. Lignin biomaterial as agricultural drug carrier. Beneficiário: Max-Planck-Gesellschaft Zur Förderung Der Wissenschaften Ev, Institut Für Biotechnologie Und Wirkstoff-Forschung Ggmbh. Número da patente: WO2017134308A1. Data de arquivamento: 2017-02-06.
- 86.** Gordobil, O. *et al.* Potential use of kraft and organosolv lignins as a natural additive for healthcare products. *RSC Adv.* 8, 24525–24533, **2018**. doi: 10.1039/c8ra02255k
- 87.** Amorati, R., Foti, M. C. & Valgimigli, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10835–10847, **2013**. doi: dx.doi.org/10.1021/jf403496k
- 88.** Oliveira, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Rev. Bras. Plantas Med.* 17, 36–44, **2015**. doi: 10.1590/1983-084X/12\_165
- 89.** Sari, M., Chung, Y., Agatha, F. & Kim, H. K. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of phenolic lipids produced by the transesterification of 4-hydroxyphenylacetic acid and triglycerides. *Appl. Biol. Chem.* 62, 5, **2019**. doi: <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0419-3>
- 90.** Pan, X., Kadla, J. F., Ehara, K., Gilkes, N. & Saddler, J. N. Organosolv Ethanol Lignin from Hybrid Poplar as a Radical Scavenger: Relationship between Lignin Structure, Extraction Conditions, and Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5806–5813, **2006**. doi: 10.1021/jf0605392

- 91.** Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. & Çapanoğlu, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1028–1045, **2016**. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04743
- 92.** Final Report on the Safety Assessment of BHT. *International Journal of Toxicology*, 21(Suppl. 2):19–94, 77, **2002**. doi: 10.1080/1091581029009651 3
- 93.** Butnariu, M. & Sarac, I. Essential Oils from Plants. *J. Biotechnol. Biomed. Sci.* 1, 35–43, **2018**. doi: 10.1302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489
- 94.** Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30, **1995**. doi: 0023-6438/95/010025
- 95.** Estatísticas de câncer. *INCA - Instituto Nacional de Câncer* (2018). Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. (Acessado dia: 22/04/2019)
- 96.** WHO | Skin cancers. *WHO* Disponível em: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/>. (Acessado dia: 22/04/2019)
- 97.** Prado, G., Svoboda, R. M. & Rigel, D. S. What's New in Melanoma. *Dermatol. Clin.* 37, 159–168, **2019**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.det.2018.12.005>
- 98.** Singer, S., Karrer, S. & Berneburg, M. Modern sun protection. *Curr. Opin. Pharmacol.* 46, 24–28, **2019**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.12.006>
- 99.** McSweeney, P. C. The safety of nanoparticles in sunscreens: An update for general practice. *Clinical*, 45, 6, 397, **2016**
- 100.** Danovaro, R. *et al.* Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections. *Environ. Health Perspect.* 116, 441–447, **2008**. doi:10.1289/ehp.10966
- 101.** Lignin boosts sunscreen performance | Research | Chemistry World. Disponível em: <https://www.chemistryworld.com/news/lignin-boosts-sunscreen-performance/7817.article>. (Acessado dia: 22/04/2019)

- 102.** Ugartondo, V., Mitjans, M. & Vinardell, M. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresour. Technol.* 99, 6683–6687, **2008**. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.038
- 103.** Melo, A., Amadeu, M. S., Lancellotti, M., Hollanda, L. M. de & Machado, D. The Role of Nanomaterials in Cosmetics: National and International Legislative Aspects. *Quím. Nova*, **2015**. doi:10.5935/0100-4042.20150042
- 104.** Kumar, C. S. S. R. Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D. *Mater. Today* 12, 24–30, **2010**. ISSN:1369 7021
- 105.** Duan, H., Wang, D. & Li, Y. Green chemistry for nanoparticle synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 44, 5778–5792, **2015**. doi: 10.1039/c4cs00363b
- 106.** Jeong, E. *et al.* Different susceptibilities of bacterial community to silver nanoparticles in wastewater treatment systems. *J. Environ. Sci. Health Part A* 49, 685–693, **2014**. doi: 10.1080/10934529.2014.865454
- 107.** Rezende, C. *et al.* Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels* 4, 54, **2011**. doi: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-54>
- 108.** Romdhane, A., Arousseau, M., Guillet, A. & Mauret, E. Effect of pH and ionic strength on the electrical charge and particle size distribution of starch nanocrystal suspensions. *Starch - Stärke* 67, 319–327, **2015**. doi: 10.1002/star.201400181
- 109.** Dizhbite, T. Characterization of the radical scavenging activity of lignins - natural antioxidants. *Bioresour. Technol.* **95**, 309–317, **2004**. doi:10.1016/j.biortech.2004.02.024
- 110.** Dutra, E. A., Oliveira, D. A. G. da C., Kedor-Hackmann, E. R. M. & Santoro, M. I. R. M. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 40, 381–385, **2004**. doi: 10.1590/S1516-93322004000300014

- 111.** Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J. & Marlowe, E. A Comparison of in vivo and in vitro Testing of Sunscreening Formulas. *Photochem. Photobiol.* 29, 559–566, **1979**. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x>
- 112.** Moreira-Vilar, F. C., Siqueira-Soares, R. de C., Finger-Teixeira, A., de Oliveira, D. M. & Ferro, A. P. The Acetyl Bromide Method Is Faster, Simpler and Presents Best Recovery of Lignin in Different Herbaceous Tissues than Klason and Thioglycolic Acid Methods. 9(10), **2014**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110000>
- 113.** Delbecq, F. *et al.* Hydrolysis of Hemicellulose and Derivatives—A Review of Recent Advances in the Production of Furfural. *Front. Chem.* 6, 146, **2018**. doi: 10.3389/fchem.2018.00146
- 114.** States, U. A <sup>13</sup>C CP/MAS-Based Nondegradative Method for Lignin Content Analysis. 1–10, **2015**. doi:10.1021/sc500628s
- 115.** Arni, S. A. Extraction and isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: A review. *Ind. Crops Prod.* 115, 330–339, **2018**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.012>
- 116.** Hu, G., Cateto, C., Pu, Y., Samuel, R. & Ragauskas, A. J. Structural Characterization of Switchgrass Lignin after Ethanol Organosolv Pretreatment. *Energy Fuels* 26, 740–745, **2012**. doi: [dx.doi.org/10.1021/ef201477p](https://doi.org/10.1021/ef201477p)
- 117.** Serrano, L. *et al.* Fast, Easy, and Economical Quantification of Lignin Phenolic Hydroxyl Groups: Comparison with Classical Techniques. *Energy Fuels* 32, 5969–5977, **2018**. doi: 10.1021/acs.energyfuels.8b00383
- 118.** Rao, X. *et al.* Assembly of Organosolv Lignin Residues into Submicron Spheres: The Effects of Granulating in Ethanol/Water Mixtures and Homogenization. *ACS Omega* 2, 2858–2865, **2017**. doi: 10.1021/acsomega.7b00285
- 119.** Kumar, M., Dixit, S. K., Singh, S. K. & Agarwal, A. Eco-Friendly Process for Recovery of Pyridine and/or Its Derivatives. Beneficiário: Jubilant Organosys Limited, UttarPradesh (IN). Número da patente: US 8,057,643 B2. Data de arquivamento: 2011-11-15.

- 120.** Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*, Elsevier, California, USA, 3rd Edition, 253-282; 501-504, **2011**. ISBN: 978-0-12-391927-4.
- 121.** Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*, Elsevier, California, USA, 3rd Edition, 548, **2011**. ISBN: 978-0-12-391927-4
- 122.** Choucair, A. A., Kycia, A. H. & Eisenberg, A. Kinetics of Fusion of Polystyrene- *b* - poly(acrylic acid) Vesicles in Solution. *Langmuir* 19, 1001–1008, **2003**. doi: 10.1021/la026187k
- 123.** Jain, A., Purohit, C. S., Verma, S. & Sankararamakrishnan, R. Close Contacts between Carbonyl Oxygen Atoms and Aromatic Centers in Protein Structures:  $\pi\cdots\pi$  or Lone-Pair $\cdots\pi$  Interactions? *J. Phys. Chem. B* 111, 8680–8683, **2007**. doi: 10.1021/jp072742I
- 124.** Morrison, Ian D., S. R. *Colloidal Dispersions. Suspensions, Emulsions and Foams*. Wiley-Interscience, 388-390, **2002**. ISBN: 0-471-17625-7
- 125.** Ostwald ripening - Soft-Matter. Disponível em: [http://soft-matter.seas.harvard.edu/index.php/Ostwald\\_ripening](http://soft-matter.seas.harvard.edu/index.php/Ostwald_ripening). (Acessado dia: 10/05/2019)
- 126.** Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H. & Finkel, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int. J. Cosmet. Sci.* 28, 359–370, **2006**. doi: 10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x
- 127.** Foti, M. C. Use and Abuse of the DPPH • Radical. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8765–8776, **2015**. doi: 10.1021/acs.jafc.5b03839
- 128.** Li, Z., Zhang, J., Qin, L. & Ge, Y. Enhancing Antioxidant Performance of Lignin by Enzymatic Treatment with Laccase. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 2591–2595, **2018**. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b04070
- 129.** Kaur, R., Uppal, S. K. & Sharma, P. Antioxidant and Antibacterial Activities of Sugarcane Bagasse Lignin and Chemically Modified Lignins. *Sugar Tech* 19, 675–680, **2017**. doi: 10.1007/s12355-017-0513-y

- 130.** Falkehag, S. I., Marton, J. & Adler, E. Chromophores in Kraft Lignin. in *Lignin Structure and Reactions* (ed. Marton, J.) American Chemical Society 59, 75–89, **1966**
- 131.** Kai, D. *et al.* Dual functional anti-oxidant and SPF enhancing lignin-based copolymers as additives for personal and healthcare products. *RSC Adv.* 6, 86420–86427, **2016**. doi: 10.1039/c6ra21433a
- 132.** Latha, M. S. *et al.* Sunscreening Agents A Review. *J. Clin. Aesthetic Dermatol.* 6, 16–26, **2013**
- 133.** Protetor solar colorido barra dano da luz visível à pele. *AGÊNCIA FAPESP* Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/protetor-solar-colorido-barra-dano-da-luz-visivel-a-pele-/26531/>. (Acessado dia: 11/05/2019)
- 134.** Tonolli, P. N. *et al.* Lipofuscin Generated by UVA Turns Keratinocytes Photosensitive to Visible Light. *J. Invest. Dermatol.* 137, 2447–2450, **2017**. doi:10.1016/j.jid.2017.06.018
- 135.** Paula, L. R. de. Determinação in vitro do fator de proteção solar de preparações cosméticas usando dispositivos fotoquímicos nanoestruturados. (Universidade de São Paulo) **2010**. doi:10.11606/D.46.2010.tde-03032011-082104