



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CELSO PIRES DE ARAUJO JUNIOR

MODIFICAÇÃO DA LIGNINA ACETOSSOLVE PARA APLICAÇÃO COMO
AGENTE ANTIOXIDANTE

FORTALEZA

2020

CELSO PIRES DE ARAUJO JUNIOR

MODIFICAÇÃO DA LIGNINA ACETOSSOLVE PARA APLICAÇÃO COMO
AGENTE ANTIOXIDANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Judith Pessoa de Andrade Feitosa

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

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A688m Araujo Junior, Celso Pires de.

Modificação da lignina acetossolve para aplicação como agente antioxidante / Celso Pires de Araujo Junior. – 2020.

136 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa .

Coorientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

1. Lignina. 2. Antioxidante. 3. Emulsões de Pickering. 4. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 540

CELSO PIRES DE ARAUJO JUNIOR

MODIFICAÇÃO DA LIGNINA ACETOSSOLVE PARA APLICAÇÃO COMO AGENTE
ANTIOXIDANTE

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Química
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito para obtenção do título de Doutor
em Química.

Área de Concentração: Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Judith Pessoa de Andrade Feitosa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Jeanny da Silva Maciel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Adriano Lincoln Albuquerque Mattos
Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT)

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT)

Aos que me são caros

AGRADECIMENTOS

A família pelo apoio.

A minha amada pelo incentivo, companheirismo e toda sorte de ajuda.

A Dr^a. Morsyleide de Freitas Rosa pelas orientações, pelas sugestões e pela amizade.

A Prof^a. Dr^a Judith Pessoa de Andrade Feitosa pelas orientações, pelas sugestões e pela amizade.

Ao Dr. Adriano Lincoln Albuquerque Mattos, pelas discussões construtivas e pelo suporte técnico.

A banca examinadora por ter aceito o convite.

Ao Dr. Venicius Gonçalves Sombra pelas diversas análises.

Ao Dr. André Luís Sousa Pereira pelo suporte técnico, pelas discussões e pela sua imensa disponibilidade em ajudar.

A Dr^a. Fábria Karine Andrade pelas análises e discussões sobre citotoxicidade.

Ao Prof. Dr Diego Lomonaco pelas discussões e contribuições.

A Nádia pelos FTIR.

Aos meus amigos.

Aos colegas e colaboradores do Laboratório da Tecnologia da Biomassa - LTB.

Ao Laboratório de Tecnologia de Embalagens de Alimentos – LTE.

Ao Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita – LFTP.

Ao Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais- LMQPN.

Ao Laboratório de Polímeros- LAPOL.

Ao Laboratório de Frutos Tropicais- LFT.

Ao Laboratório de Cultura de Células.

A Embrapa Agroindústria Tropical.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química.

A Universidade Federal do Ceará – UFC.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.” (Carl Sagan)

RESUMO

Diversas palmeiras oleaginosas se desenvolvem no clima quente e úmido das regiões tropicais. Dentre elas destaca-se o dendezeiro (*Elaeis guineensis*), que é a principal fonte de óleo de palma e palmiste. A torta do dendê (mesocarpo), rica em lignina, é um coproduto da extração do óleo. A lignina tem propriedades antioxidante e anti-UV; logo, apresenta um grande potencial para ser usado como antioxidante. O objetivo desse trabalho foi caracterizar e avaliar a aplicação da lignina acetossolve alquilada obtida do resíduo do dendê como antioxidante em emulsões do tipo de Pickering. Para lignina acetossolve autohidrolisada (LA) uma etapa adicional de auto hidrólise em um reator de alta pressão foi realizada antes do processo acetossolve convencional. Os produtos foram obtidos através alquilação de Friedel-Crafts das ligninas. Análises de GPC, FTIR, RMN, TGA, DSC, e atividade antioxidante foram realizadas. Os produtos obtidos tiveram maior atividade antioxidante do que a matéria-prima, as quais foram confirmadas pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. As emulsões de Pickering com celulose bacteriana nanofibrilada mostraram elevada estabilidade, com ausência de separação de fases, mesmo ao longo de 60 dias de armazenamento. Os ensaios de citotoxicidade apresentaram elevada porcentagem de células viáveis para os produtos alquilados até concentração de 60 µg/mL que representa mais que o triplo da concentração necessária dos produtos para atuarem como antioxidantes em cosméticos. Já o BHT para as concentrações em que é usado como antioxidante apresentou citotoxicidade. Desse modo, a aplicação da lignina alquilada em emulsões de Pickering é bastante promissora.

Palavras-chave: Lignina. Antioxidante. Emulsões de Pickering. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Several oil palm trees thrive in the hot and humid climate of the climatic regions. Among them are the oil palm (*Elaeis guineensis*), which is the main source of palm and palm kernel oil. The oil palm pie (mesocarp), rich in lignin, is a co-product of oil extraction. Lignin has antioxidant and anti-UV properties; therefore, it has great potential to be used as an antioxidant. The objective of this work was to characterize and evaluate the application of alkylated acetosolve lignin obtained from palm oil as an antioxidant in Pickering emulsions. Auto-hydrolysed acetosolve lignin (LA) an additional step of auto-hydrolysis in a high pressure reactor was performed before the conventional acetosolve process. The products were obtained by Friedel-Crafts alkylation of the lignins. Analyzes of GPC, FTIR, NMR, TGA, DSC, and antioxidant activity were performed. The products obtained had greater antioxidant activity than the raw material, which were confirmed by the DPPH, ABTS and FRAP methods. Pickering emulsions with nanofibrillated bacterial cellulose showed high stability, with no phase separation, even over 60 days of storage. The cytotoxicity tests showed a high percentage of viable cells for the alkylated products up to a concentration of 60 µg/mL, which represents more than three times the concentration of the products needed to act as antioxidants in cosmetics. BHT for concentrations at which it is used as an antioxidant showed cytotoxicity. Thus, the application of alkylated lignin in Pickering emulsions is very promising.

Keywords: Lignin. Antioxidant. Pickering emulsions. Cytotoxicity

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- (a) Principais partes do Dendenzeiro e (b) Frutos do dendenzeiro e suas principais partes	22
Figura 2	- Precusores e unidades estruturais da lignina	24
Figura 3	- Estrutura química da lignina	25
Figura 4	- Formação do carbocátion benzílico na lignina em condições ácidas	28
Figura 5	- Reação de bromação do benzeno	30
Figura 6	- Reação de cloração do benzeno	30
Figura 7	- Reação genérica de um eletrófilo (E) com o benzeno	31
Figura 8	- Reação de alquilação de Friedel–Crafts	31
Figura 9	- Estruturas dos antioxidantes BHT e BHA	34
Figura 10	- Mecanismo de atuação de um antioxidante. Bz corresponde a um grupo benzil	36
Figura 11	- Mecanismo do processo oxidativo	36
Figura 12	- Mecanismo de atuação de um antioxidante na borracha nitrílica	37
Figura 13	- Ilustração dos principais componentes de uma emulsão	42
Figura 14	- Uma emulsão pode sofrer separação pelos processos de coalescência, floculação, sedimentação e quebra.....	43
Figura 15	- Processo de obtenção da Lignina (L) e (LA)	51
Figura 16	- Curva padrão de Trolox para ABTS	62
Figura 17	- Curva padrão de Trolox para FRAP	63
Figura 18	- Porcentagem de ácidos graxos da lignina LE e Produto PE-10	68
Figura 19	- Porcentagem de ácidos graxos da lignina LAE e produto PAE-20 ...	69
Figura 20	- Matéria-prima e produto de lignina alquilada obtido	69
Figura 21	- FTIR das amostras LE, LAE, PE-10 e PAE-20	71
Figura 22	- Espectro de ¹ H RMN da Lignina LE (300 MHz, 60mg/mL, DMSO, 27 °C)	72
Figura 23	- Espectro de ¹ H RMN da Lignina PE-10 (300 MHz, 60mg/mL, DMSO, 27 °C)	73
Figura 24	- Espectro de ¹ H RMN da Lignina LAE (300 MHz, 60mg/mL, DMSO, 27 °C)	73

Figura 25	- Espectro de ¹ H RMN da Lignina PAE-20 (300 MHz, 60mg/mL, DMSO, 27 °C)	74
Figura 26	- Regiões alifáticas dos espectros de RMN HSQC da lignina LE	77
Figura 27	- Regiões alifáticas dos espectros de RMN HSQC da lignina PE-10 ...	77
Figura 28	- Regiões alifáticas dos espectros de RMN HSQC da lignina LAE	78
Figura 29	- Regiões alifáticas dos espectros de RMN HSQC da lignina PAE- 20	78
Figura 30	- Regiões aromáticas dos espectros de RMN HSQC da Lignina LE ...	79
Figura 31	- Regiões aromáticas dos espectros de RMN HSQC da Lignina PE-10	80
Figura 32	- Regiões aromáticas dos espectros de RMN HSQC da Lignina LAE	80
Figura 33	- Regiões aromáticas dos espectros de RMN HSQC da Lignina PAE-20	81
Figura 34	- Principais subestruturas de ligninas e produtos. subestruturas β-O-4' (A); subestruturas resinol (B); subestruturas de fenilcoumaranos (C); subestruturas de dibenzodioxocina (D); unidades guaiacila (G); unidades de siringila (S); unidades de p-hidroxifenila (H)	82
Figura 35	- Regiões aromáticas dos espectros RMN HMBC da lignina LE	83
Figura 36	- Regiões aromáticas dos espectros RMN HMBC da lignina PE-10 ...	84
Figura 37	- Regiões aromáticas dos espectros RMN HMBC da lignina LAE	84
Figura 38	- Regiões aromáticas dos espectros RMN HMBC da lignina PAE-20.	85
Figura 39	- Provável estrutura do produto formado a partir da lignina LE	86
Figura 40	- Prováveis estruturas formadas a partir das ligninas LE e LAE	87
Figura 41	- Cromatogramas das ligninas LE e do produto PE-10	89
Figura 42	- Cromatogramas da lignina LAE e produto PAE-20	90
Figura 43	- TGA e DTG da amostra LE em N ₂	92
Figura 44	- TGA e DTG da amostra LAE em N ₂	92
Figura 45	- TGA e DTG da amostra PE-10 em N ₂	93
Figura 46	- TGA e DTG da amostra PAE-20 em N ₂	93
Figura 47	- DSC da matéria-prima LE (acima) e produto PE-10 (abaixo)	95
Figura 48	- DSC da matéria-prima LAE (acima) e produto PAE-20 (abaixo)	96
Figura 49	- Espectro UV-vis matéria-prima e produtos em dioxano [0,5 mg/mL]	97
Figura 50	- Atividade antioxidante das amostras	98
Figura 51	- Principais componentes da emulsão de Pickering	101

Figura 52	- Micrografia da emulsão do Branco após 0 e 60 dias de armazenamento.....	102
Figura 53	- Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão do branco após 0 e 60 dias de armazenamento	102
Figura 54	- Micrografia da emulsão LE após 0 e 60 dias de armazenamento ...	103
Figura 55	- Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão LE após 0 e 60 dias de armazenamento	104
Figura 56	- Micrografia da emulsão PE-10 após 0 e 60 dias de armazenamento	104
Figura 57	- Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão PE-10 após 0 e 60 dias de armazenamento	105
Figura 58	- Micrografia da emulsão LAE após 0 e 60 dias de armazenamento ...	105
Figura 59	- Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão LAE após 0 e 60 dias de armazenamento	106
Figura 60	- Micrografia da emulsão PAE-20 após 0 e 60 dias de armazenamento	106
Figura 61	- Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão PAE-20 após 0 e 60 dias de armazenamento	107
Figura 62	- Comparação entre emulsão do branco e com adição das amostras	109
Figura 63	- Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado	112
Figura 64	- Ensaio de citotoxicidade da emulsão LE para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado	114
Figura 65	- Ensaio de citotoxicidade da emulsão PE-10 para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado	114

Figura 66	- Ensaio de citotoxicidade da emulsão LAE para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado	115
Figura 67	- Ensaio de citotoxicidade da emulsão PAE-20 para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado	115
Figura 68	- Ensaio de citotoxicidade da emulsão com antioxidante comercial BHT para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AlCl ₃	Cloreto de Alumínio
BHT	di-terc-butil metil fenol (Antioxidante comercial)
CBNOX	Celulose bacteriana nanofibrilada oxidada
C ₄ H ₈ O ₂	Acetato de etila
C ₄ H ₉ Cl	Cloreto de Terc-Butila
C ₄ H ₈ O ₂	1,4 dioxano
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil
EC ₅₀	Concentração da substancia que induz redução da metade do efeito máximo
FeCl ₃ • 6H ₂ O	Cloreto de ferro (III) hexahidratado
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
IC	Índice de grupos carboxila da amostra
IP	Índice de polidispersividade
KBr	Brometo de potássio
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potássio 140 mM
L	Lignina Acetossolve
P-10	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve e 10% de catalisador
P-15	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve e 15% de catalisador
P-20	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve e 20% de catalisador
%L	Porcentagem de lignina na fibra

LAA	Lignina Acetossolve com pré-tratamento de auto hidrólise
MLF	Massa de lignina teórica em grama (se o rendimento fosse 100%)
MLO	Massa de lignina obtida após a extração (rendimento experimental)
MMA	Massa da matéria-prima após a auto hidrólise
MMI	Massa da matéria-prima inicial em g
Mw	Massa molar ponderada média
Mn	Massa molar numérica média
NaH ₂ PO ₄	Dihidrogenofostafo de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio anidro
OH totais	Teor de hidroxilas totais
PA-10	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve com pré-tratamento de auto hidrólise e 10% de catalisador
PA-15	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve com pré-tratamento de auto hidrólise e 15% de catalisador
PA-20	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve com pré-tratamento de auto hidrólise e 20% de catalisador
LE	Lignina Acetossolve após processo de remoção de extrativos
PE-10	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve e 10% de catalisador após processo de remoção de extrativos
PE-15	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve e 15% de catalisador após processo de remoção de extrativos
PE-20	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve e 20% de catalisador após processo de remoção de extrativos
LAE	Lignina Acetossolve com pré-tratamento de auto hidrólise após processo de remoção de extrativos
PAE-10	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve com pré-tratamento de auto hidrólise e 10% de catalisador após processo de remoção de extrativos
PAE-15	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve com pré-tratamento de auto hidrólise e 15% de catalisador após processo de remoção de extrativos

PAE-20	Produto alquilado obtido a partir Lignina Acetossolve com pré-tratamento de auto hidrólise e 20% de catalisador após processo de remoção de extrativos
RA%	Rendimento da matéria-prima obtida após a auto hidrólise em porcentagem
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxilo
TGA	Análise termogravimétrica
TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazina
Trolox ®	6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilchroman-2- ácido carboxílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	A cultura do dendê	21
2.1.1	<i>Torta do dendê</i>	21
2.2	Lignina	23
2.2.1	<i>Aplicações da Lignina</i>	28
2.2.2	<i>Reações de modificação da lignina</i>	29
2.3	Compostos antioxidantes	32
2.3.1	<i>Mecanismo dos Compostos antioxidantes</i>	35
2.3.2	<i>Métodos para determinar atividade antioxidante</i>	38
2.4	Emulsões Pickering	41
2.4.1	<i>Celulose Bacteriana</i>	44
2.4.2	<i>Aplicações de emulsões Pickering de Cosméticos</i>	45
3	OBJETIVO GERAL	47
3.1	Objetivos específicos	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	Materiais	48
4.2	Preparo da matéria-prima	49
4.3	Caracterização da matéria-prima	49
4.4	Extração da lignina acetossolve (L)	49
4.4.1	<i>Sem pré-tratamento de auto hidrólise (L)</i>	49
4.4.2	<i>Com pré-tratamento de auto hidrólise (LA)</i>	50
4.5	Nanofibrilas de celulose	51
4.5.1	<i>Celulose Bacteriana</i>	51
4.5.2	<i>Nanofibrilas de celulose bacteriana oxidada (CBNOX)</i>	52
4.6	Caracterização das Nanofibrilas de celulose	52

4.6.1	<i>Determinação do Teor de Carboxilato</i>	52
4.6.2	<i>Determinação do Potencial Zeta</i>	53
4.7	Caracterização das ligninas acetossolve	53
4.7.1	<i>Determinação de hidroxilas fenólicas</i>	53
4.7.2	<i>Determinação do teor de hidroxilas totais</i>	54
4.7.3	<i>Determinação do teor de grupos carboxila</i>	54
4.8	Obtenção das ligninas modificadas pela reação de alquilação (P, PA) .	55
4.9	Remoção de extrativos da matéria-prima e produtos	56
5	MÉTODOS GERAIS DE CARACTERIZAÇÃO	58
5.1	Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C	58
5.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	58
5.3	Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa	59
5.4	Caracterização Térmica	59
5.5	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	59
5.6	Espectroscopia de absorção na região de UV-VIS	60
5.7	Atividade antioxidante da lignina	60
5.7.1	<i>Atividade antioxidante pelo método DPPH</i>	60
5.7.2	<i>Atividade antioxidante pelo método TEAC/ABTS</i>	61
5.7.3	<i>Atividade antioxidante pelo método FRAP</i>	62
5.8	Caracterização das Nanofibrilas de celulose	63
5.8.1	<i>Determinação do Teor de carboxilato e grau de oxidação</i>	63
5.8.2	<i>Determinação do potencial Zeta</i>	63
5.9	Emulsões de Pickering	63
5.9.1	<i>Formulações</i>	63
5.9.2	<i>Determinação do volume das gotas da emulsão</i>	64
5.9.3	<i>Ângulo de contato do azeite, celulose bacteriana (CBNOX) e amostras</i>	64
5.10	Ensaio de citotoxicidade do Alamar Blue ®	64

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
6.1	Caracterização da matéria-prima	66
6.2	Rendimentos da lignina	66
6.3	Determinação de hidroxilas totais, fenólicas e carboxilas da lignina	67
6.4	Teor de extrativos da matéria-prima e produtos	67
6.5	Rendimentos dos produtos alquilados (PE-10, PAE-20)	69
6.6	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	70
6.7	Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C	72
6.8	Cromatografia de Permeação em Gel – GPC	87
6.9	Caracterização Térmica	91
6.9.1	<i>Análise termogravimétrica</i>	91
6.9.2	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>	93
6.10	Espectroscopia de absorção na região de UV-VIS	97
6.11	Atividade antioxidante da lignina	98
6.12	Emulsões de Pickering das Amostras	101
6.12.1	<i>Ângulo de contato do azeite, celulose bacteriana (CBNOX) e amostras</i>	110
6.13	Ensaio de citotoxicidade do Alamar Blue ®	112
7	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	120
	APÊNDICE A-ESQUEMA DE OBTENÇÃO DOS PRODUTOS	132
	APÊNDICE B - ESPECTRO HSQC DA AMOSTRA LE	133
	APÊNDICE C - ESPECTRO HSQC DA AMOSTRA PE-10	134
	APÊNDICE D - ESPECTRO HSQC DA AMOSTRA LAE	135

APÊNDICE E - ESPECTRO HSQC DA AMOSTRA PAE-20.....	136
--	------------

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da ONU, a população mundial atual de 7,7 bilhões é projetada para aumentar em 800 milhões nos próximos 10 anos e chegar a 9,7 bilhões em 2050, o que gera uma demanda gigantesca por recursos naturais (United Nations, 2019). Grandes quantidades de biomassa se acumulam das atividades florestais, agrícolas e urbanas. De imediato, surge uma necessidade de aproveitamento integral da biomassa que, além de ser abundante, pode reduzir os custos de produção e minimizar os danos ambientais. Nesses quesitos o dendê se destaca como uma fonte promissora de biomassa.

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é uma palmeira oleaginosa de origem africana que se desenvolve no clima quente e úmido das regiões tropicais. A importância econômica da palmeira deve-se, fundamentalmente, ao seu fruto. Dos cachos são extraídos o óleo de palma, obtido da extração da polpa (mesocarpo) dos frutos, e o óleo de palmiste, extraído da amêndoa do fruto. Os dois óleos são amplamente utilizados em diversas indústrias, tais como de alimentos, cosmética/farmacêutica, tintas/revestimentos e óleoquímica (FERRER *et al.*, 2013). Estima-se um aumento na produção dessa oleaginosa nos próximos anos, o que estará diretamente relacionado ao aumento no volume de resíduos e coprodutos gerados (ANDRADE, 2015).

O óleo de dendê corresponde a 60% do mercado mundial de óleos, com previsão de aumento na produção nos próximos anos (USDA, 2019). No Brasil, a expansão no cultivo dessa palmeira se deu devido a incentivos fiscais e subsídios para produção de biodiesel visando a demanda do mercado interno (BRANDÃO, SCHONEVELD e PACHECO, 2018).

A torta do dendê (fibras da prensagem do mesocarpo) é um coproduto da extração do óleo de palma. Além disso, a torta é rica em lignina. Apesar de ser usada como combustível de caldeira ou misturada na ração animal, carece de estudos que visem à obtenção de produtos de maior valor agregado.

Segundo Panzella e Napolitano (2018), o número de estudos que sugerem a utilização da biomassa como fonte de produtos químicos sustentáveis para o uso direto bem como para posteriores modificações tem crescido nos últimos cinco anos.

Nesse cenário também se destaca a lignina como o segundo polímero orgânico renovável mais abundante no planeta, ficando atrás apenas da celulose (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2017; COLLINS et al., 2019). A indústria do papel é responsável por gerar grandes volumes de lignina, que é subaproveitada através da queima para obter energia e recuperar alguns compostos químicos (CHIANG; PAN, 2017).

A lignina é uma macromolécula polifenólica biossintetizada pelas plantas. Os grupos hidroxila presentes na estrutura aromática serve como proteção contra as condições adversas do meio. Ela também é amplamente investigada para fins anti-inflamatório, antibacteriano e anticarcinogênico. A lignina possui atividade antioxidante, capacidade de prevenir ou retardar processos oxidativos, sendo usada para prevenir a bio e fotodegradação de blendas poliméricas (LU; RALPH, 2014).

Dentre os diversos métodos de extração da lignina a polpação organossolve destaca-se por apresentar diversas vantagens; tais como baixo ponto de ebulição dos solventes, simplicidade do processo, além de serem livres de elementos como enxofre, o que torna o método mais ambientalmente correto (LU et al., 2012). Os diferentes processos organossolve possuem grande influência na funcionalidade, pureza, massa molar e grau de ligações cruzadas (*crosslinking*) da lignina e, conseqüentemente, nas suas propriedades físico-químicas, como atividade antioxidante e propriedades térmicas (Bras et al., 2010; LU; RALPH, 2014).

As reações de modificação tendo como matéria-prima a lignina visando o aumento da atividade antioxidante, são de grande importância para retardar ou inibir inúmeros processos oxidativos. Dentre os diversos tipos de reações relatadas para a lignina na literatura, a alquilação de Friedel–Crafts, pode ser forma promissora para aumentar a atividade antioxidante.

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi obter produtos com estruturas semelhantes ao antioxidante comercial BHT. Os produtos obtidos foram aplicados em emulsões de Pickering e tiveram o uso como antioxidante avaliados. De acordo com a revisão de literatura realizada, não foram encontrados relatos sobre da aplicação da lignina alquilada em emulsões de Pickering para fins antioxidantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do dendê

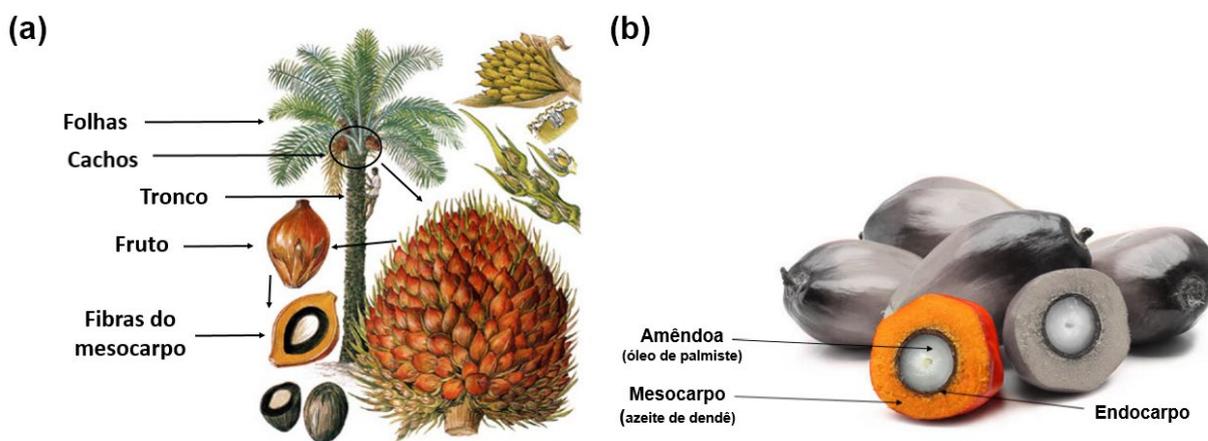
O Brasil produz 1,56 milhão de toneladas de dendê por ano (IBGE-PAM, 2018). Segundo MAPA (2018, p.08), estima uma área cultivada de 236 mil hectares no Brasil em 2016, com a maior parte desta área localizada no estado do Pará. Vale a pena salientar que tal expansão se realizou em áreas desmatadas que apresentavam condições adequadas de solo e clima, sendo uma alternativa de recomposição da cobertura vegetal. A produção brasileira de Palma de óleo é sustentável e acarreta em benefícios ambientais, sociais e econômicos às regiões de cultivo que são transmitidos aos produtos alimentícios, químicos e ao biodiesel produzidos a partir de seus óleos (MAPA, 2018). O óleo tem sido empregado como matéria-prima na obtenção do biodiesel, que pode substituir ou ser misturado ao óleo diesel derivado do petróleo (JARDINE; BARROS, 2017). Estima-se um aumento na produção dessa oleaginosa nos próximos anos, e, conseqüentemente, de resíduos (entre eles a torta de dendê) e coprodutos gerados.

Esse resíduo é muito atrativo na produção de bioetanol, pois além de ser abundante e ter baixo custo, apresenta um elevado teor de celulose que pode ser convertida em etanol (CAMPIONI *et al.*, 2019). Existem também relatos de outras aplicações tais como biocarvão, bioplástico e biocompósitos (HASSAN *et al.*, 2019), antioxidantes (NOGUEIRA *et al.*, 2018), prevenção de erosão do solo (FANG *et al.*, 2017), extração de nanocristais de celulose (NORDIN *et al.*, 2017), produção de biodiesel (LAM; JAMALLUDDIN ; LEE, 2019) e painéis de fibra sem aglutinantes (FERNANDES *et al.*, 2019).

2.1.1 Torta do dendê

A torta do dendê (resíduo fibroso da prensagem do dendê) é um coproduto da extração do óleo de palma e palmiste rico em lignina (SOUZA *et al.*, 2016). Como ilustrado na Figura 1a, o fruto do dendê é disposto em cachos que podem pesar até 20 kg e possuir 2000 frutos por vez. O fruto é formado por uma amêndoa revestida por um endocarpo duro e um mesocarpo fibroso (Figura 1b). A torta geralmente é formada da fibra do fruto, da amêndoa e do endocarpo prensados a partir dos quais são obtidos óleos.

Figura 1 - (a) Principais partes do Dendeneiro e (b) Frutos do dendeneiro e suas principais partes.



Fonte: <https://i.pinimg.com> e Bressanini, 2016.

O óleo de palmiste é extraído a partir da amêndoa encontrada dentro da noz, enquanto o óleo de palma ou azeite de dendê é extraído da polpa do fruto (mesocarpo) (Figura 1b). A diferença entre eles está na composição dos ácidos graxos presentes. No óleo de palma predominam os ácidos palmítico e oleico; no palmiste, os ácidos láurico e mirístico.

De acordo com MAPA (2018, p. 15), o óleo de palma faz parte da composição de 50% dos produtos disponíveis nos supermercados. A demanda para fins alimentícios corresponde a 72% do óleo produzido no mundo. Embora o Brasil produza cerca de 300 mil toneladas de óleo de palma, não consegue suprir a demanda do mercado interno, que corresponde a cerca de 500 mil toneladas por ano (APALMA, 2019).

O processamento do fruto apresenta o seguinte rendimento percentual: óleo de palma bruto 20%, óleo de palmiste 1,5%, torta de palmiste 3,5%, cachos vazios 22%, fibras 12%, cascas 5% e efluentes líquidos 36%. Desse modo, 42,5 % de resíduos sólidos são gerados, sendo 12% correspondente à torta do dendê (ÓLEO, 2014). O acúmulo dessa biomassa gera problemas ambientais devidos a sua conversão em metano, que contribui para o efeito estufa. Estima-se que anualmente sejam produzidas 600 mil toneladas de torta de dendê (HAFIS *et al.*, 2013). Uma alternativa promissora é o uso dessa biomassa acumulada como fonte renovável de energia.

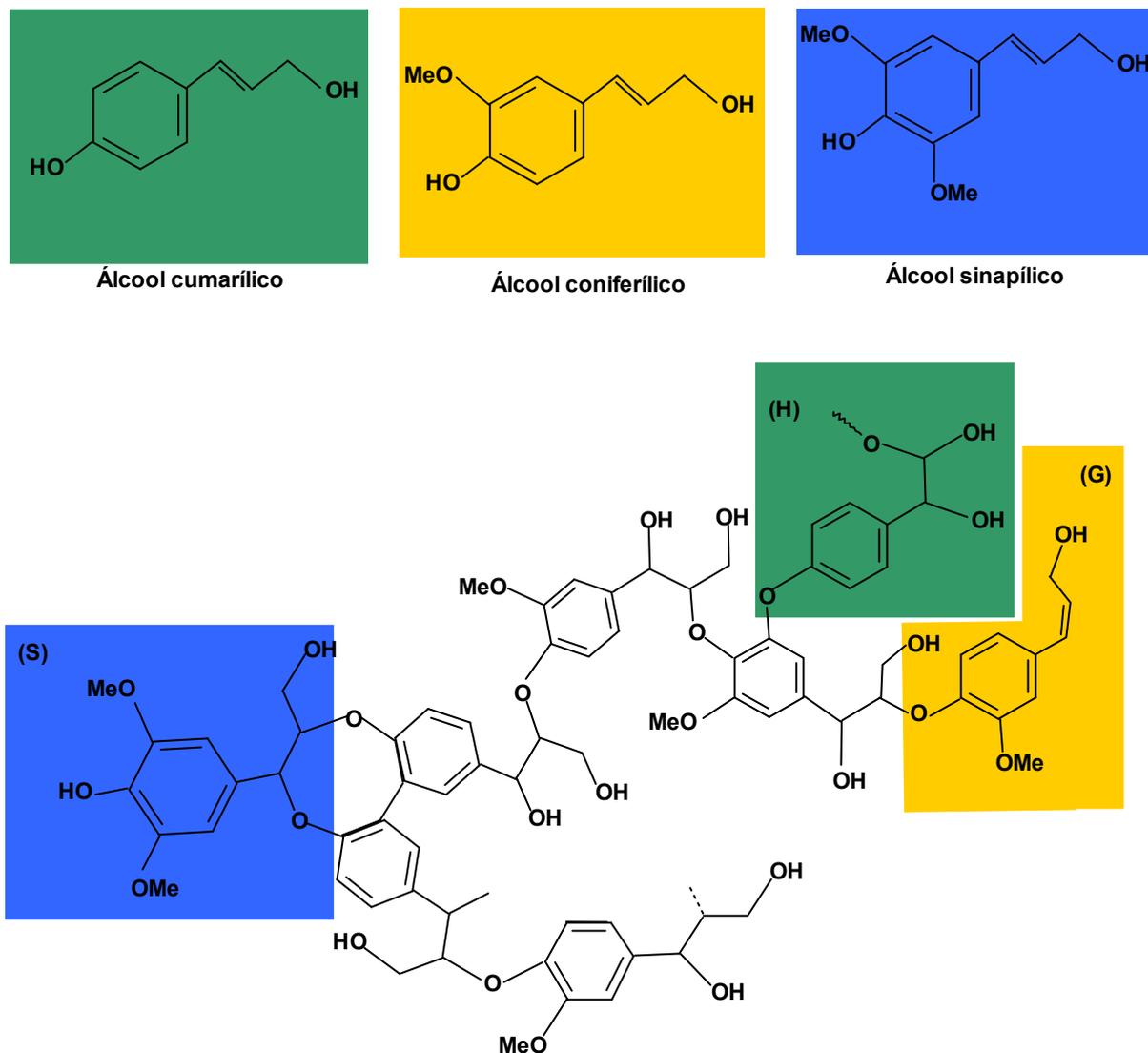
A demanda por energia bem como por matéria-prima que mantenha o ritmo do mundo moderno é crescente. Essa tendência é oposta à disponibilidade dos recursos naturais costumeiramente utilizados. Os combustíveis fósseis são recursos não renováveis, pois levam milhões de anos para se formarem, e as reservas desses combustíveis estão se esgotando, já que o consumo é maior que a produção. Tanto a produção quanto a utilização de combustíveis fósseis levantam preocupações ambientais e problemas com a saúde (OGEDA; PETRI, 2010).

A biomassa que é abundante, renovável e pode ser obtida a baixos custos é citada como um substituto promissor aos combustíveis fósseis (KASIVISVANATHAN *et al.*, 2012). Além disso, pode ser convertida em produtos de maior valor agregado tais como: em biocombustíveis, insumos químicos e energia. O objetivo de uma biorrefinaria é otimizar o uso de recursos naturais e minimizar os efluentes, maximizando os benefícios e o lucro. Segundo Panzella e Napolitano (2018), o número de estudos que sugerem a utilização da biomassa como fonte de produtos químicos sustentáveis para o uso direto, bem como posteriores modificações, tem crescido nos últimos cinco anos.

2.2 Lignina

Lignina é um termo genérico para um grande grupo de compostos aromáticos formados pela polimerização de radicais livres de monolignóis, tais como: álcool cumarílico, coniferílico e, em menor quantidade, álcool sinapílico, que variam apenas em seu grau de metoxilação (VANHOLME *et al.*, 2010). Os produtos gerados desse processo são as unidades estruturais denominadas p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Figura 2). Ligninas com um maior número de unidades G possuem a posição C5 do anel disponível o que as tornam mais reativas em relação às unidades S.

Figura 2- Precursores e unidades estruturais da lignina.

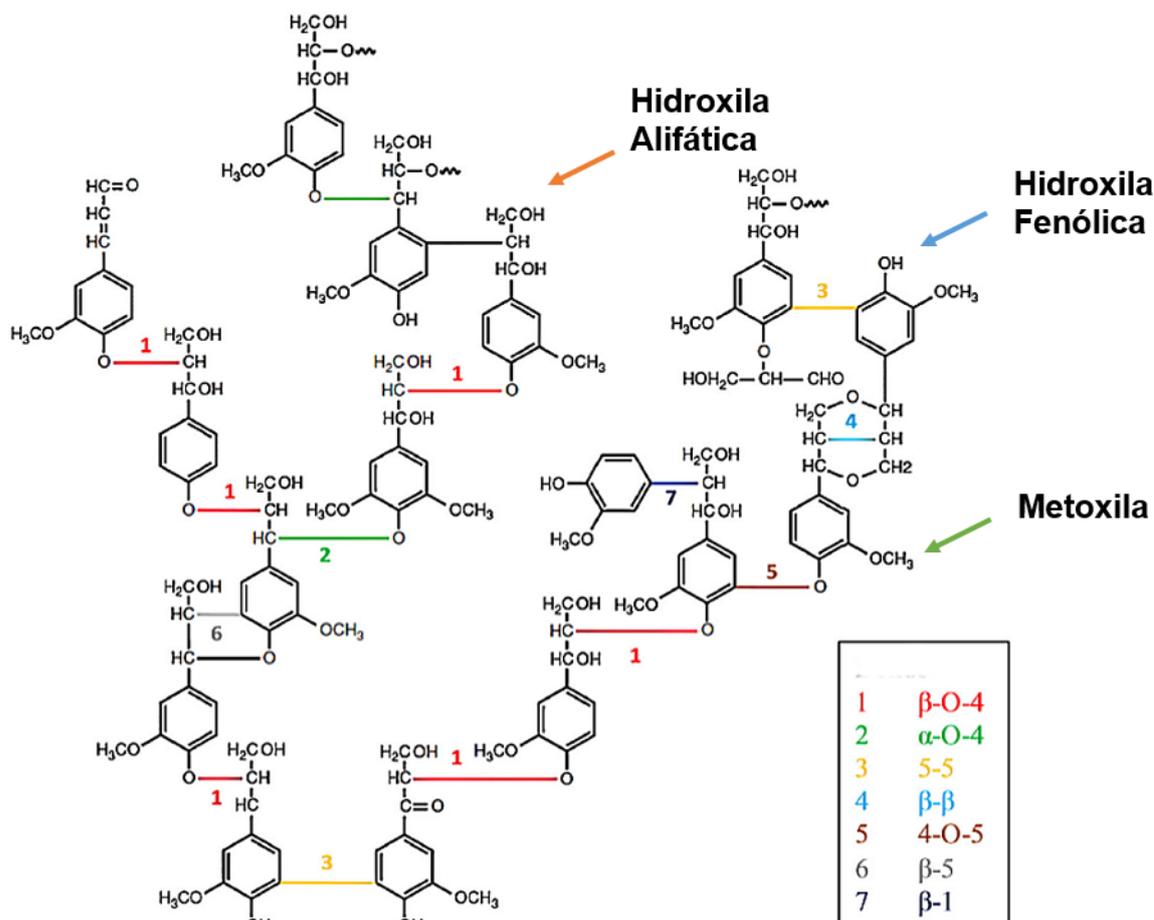


Fonte: elaborada pelo autor

Na parede celular das plantas, a lignina preenche os espaços existentes entre a hemicelulose e a celulose. Além disso, mantém os demais componentes juntos, promove o endurecimento, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais (MOHANTY; MISRA; DRZAL, 2005). O elevado teor de carbono e reduzido teor de hidrogênio sugere que a lignina possui uma estrutura altamente insaturada ou aromática. A estrutura da lignina depende da fonte de origem, sendo caracterizada pelos grupos metoxila e hidroxila

presentes (MOHANTY; MISRA; DRZAL, 2005) (Figura 3). A lignina obtida em larga escala deriva majoritariamente da indústria de papel.

Figura 3 - Estrutura química da lignina



Fonte: Laurichesse, Avérous (2014)

Bajwa *et al.* (2019) relatam que a produção mundial de lignina corresponde a 100 milhões de toneladas por ano sendo avaliada em 732,7 milhões de dólares em 2015. Todo esse montante pode ser dividido em lignina do tipo lignosulfonato (88%), Kraft (9 %) e organossolve (2%) que vem se popularizando devido a produção de combustíveis de segunda geração como o bioetanol. Entretanto, apenas 5 % da produção mundial de lignina vem sendo destinada para formulação de adesivos, dispersantes, surfactantes e antioxidantes enquanto todo o restante produzido pela indústria de papel e celulose é queimado para gerar calor e eletricidade (CARVAJAL; GÓMEZ; CARDONA, 2016).

Na última década melhorias nesse cenário foram observadas devido ao desenvolvimento de pesquisas e produtos voltados para a valorização da lignina. Essas mudanças foram impulsionadas pelo conceito de biorefinaria, bem como a necessidade de inovações no mercado de papel e celulose, tendo em vista que a valorização dos coprodutos gerados fortalece toda cadeia produtiva (BAJWA *et al.*, 2019). Para muito além disso, o acúmulo de lignina como coproduto da indústria do papel sempre foi um problema a ser superado. Soma-se a isso a necessidade do fortalecimento da crescente cadeia de biocombustíveis de segunda geração.

Previsões também indicam que com os processos de virtualização da vida moderna a dependência de papel venha a diminuir nos anos vindouros. Dadas essas condições, a clássica indústria do papel terá que se reinventar diversificando seu portfólio para se manter na ativa. Os produtos derivados da lignina podem ser uma alternativa promissora desde que possam ser produzidos em escala industrial. Também devem ser competitivos em relação aos processos tradicionais tais como kraft ou sulfito (BAJWA *et al.*, 2019).

Segundo Gellerstedt (2015), a dissolução da lignina presente na madeira pode ser obtida geralmente pelo processo Kraft ou sulfito. As fibras celulósicas são um dos produtos da polpação que podem ser utilizados na produção de embalagens e papel. Já a lignina dissolvida é denominada licor negro. No processo sulfito, a lignina é solubilizada pela introdução de grupos sulfonatos hidrofílicos, seguido da quebra dos grupos éter. Esse tipo de lignina é mais abundante no mercado mundial com valor estimado em 800.000 toneladas (AGRAWAL; KAUSHIK; BISWAS, 2014).

No processo Kraft, a estrutura da lignina é modificada e despolimerizada simultaneamente pela ação de uma solução alcalina forte e íons hidrossulfeto. Devido à presença de enxofre, o produto dessa reação apresenta um odor característico, especialmente durante o aquecimento (GELLERSTEDT, 2015). A produção mundial de polpa Kraft corresponde a 55 milhões de toneladas por ano (BAJWA *et al.*, 2019). O uso de compostos sulfurados nesse processo causa sérios impactos ambientais, devido à liberação de compostos de enxofre e à produção de organoclorados altamente tóxicos durante a etapa de branqueamento com derivados do cloro (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

Uma alternativa a esse problema é a obtenção de lignina por métodos livres de enxofre. De um modo geral, esse tipo de lignina tem tamanho macromolecular moderado e se assemelha mais com a lignina nativa. A lignina livre de enxofre pode ser oriunda de tecnologias de conversão da biomassa (produção de álcool), polpação com solventes (organossolve) e polpação soda (a partir de fontes alternativas de biomassa) (LORA; GLASSER, 2002). A polpação organossolve é um tratamento que usa solventes orgânicos para solubilizar a lignina e as hemiceluloses. O processo organossolve mais comum utiliza água/etanol ou ácido acético. Além disso, apresenta vantagens tais como: simplicidade do processo, compostos livres de enxofre, fácil reciclagem do solvente e elevada pureza dos produtos obtidos. Podem ser usados diferentes solventes como metanol, ácido fórmico, propanol, dioxano, formaldeído dentre outros (RODRIGUES; GAMBETTA, 2017).

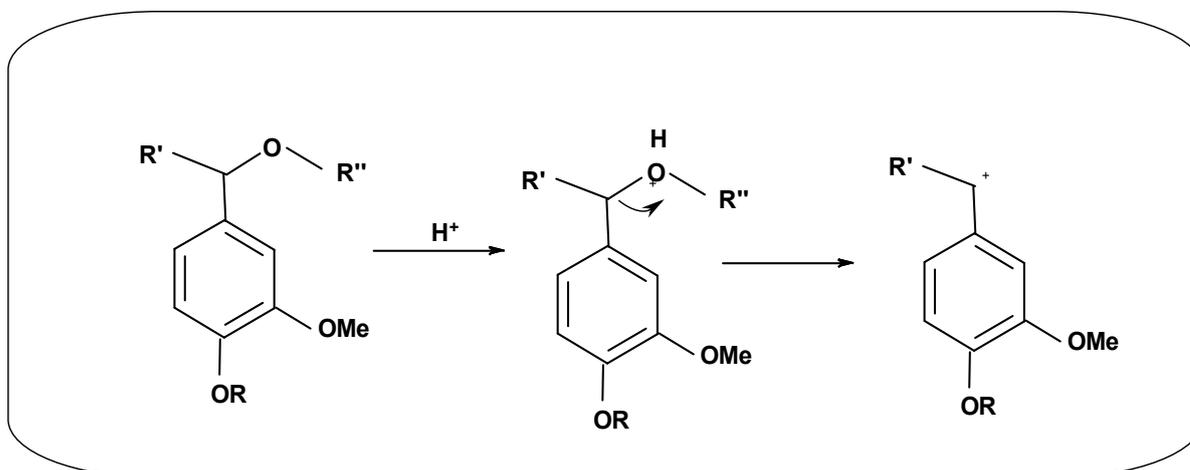
O processo organossolve dentro do conceito de biorrefinaria, é destacado como um dos processos mais promissores para o fracionamento da biomassa lignocelulósica, sendo competitivo e promissor do ponto de vista econômico e ambiental (RODRIGUES; GAMBETTA, 2017).

Segundo Macfarlane, Farid e Chen (2009), o processo organossolve de obtenção de lignina é composto por três etapas. A primeira é a solvólise, que se inicia com a quebra das ligações α aril eter da lignina. A segunda etapa é a solvatação desses fragmentos pelas moléculas do solvente, seguida da dissolução, que corresponde ao transporte dos complexos lignina-solvente no volume do fluido (terceira etapa). McDonough (1992) atribui a fragmentação da lignina no processo organossolve à quebra das ligações éter. A reação pode ser catalisada usando um ácido mineral ou por auto hidrólise devido à liberação de ácido acético produzido a partir de xilanos.

Em condições ácidas, a quebra das ligações α -eter são as mais importantes, embora as ligações β -eter também desempenhem seu papel. Em meio alcalino, essa tendência se inverte. De acordo com McDonough (1992), a condensação da lignina é um fator limitante no processo, podendo ocorrer através de carbocátions reativos, intermediários de quinona ou pela quebra direta de ligações éter com a formação de um carbocation benzílico estabilizado por ressonância (Figura

4). De um modo geral, condições de elevado tempo e temperatura favorecem as reações de condensação.

Figura 4 - Formação do carbocátion benzílico na lignina em condições ácidas.



Fonte: McDonough (1992)

2.2.1 Aplicações da Lignina

A lignina é um composto polifenólico, biossintetizado por plantas, é amplamente investigado para fins anti-inflamatórios (GRECO *et al.*, 2019), antibacteriano (AADIL *et al.*, 2019) e antioxidante (KIM *et al.*, 2019). Tais propriedades da lignina estão sendo aplicadas em produtos como loções protetoras UV (QIAN *et al.*, 2015), cosméticos (VINARDELL; UGARTONDO; MITJANS., 2008), roupas (ZIMNIEWSKA; KOZŁOWSKI; BATOG., 2008) e materiais de embalagem (ESPINOZA-ACOSTA *et al.*, 2016).

Segundo Iravani e Varma (2020), a produção de nanomateriais por métodos físico-químicos exigem materiais de alto custo e podem gerar efeitos tóxicos para o meio ambiente. Nesse cenário a lignina se destaca por ser uma biomassa abundante, biodegradável e com propriedades adequadas a aplicações como agentes de reforço em nanocompósitos, liberação controlada e outras aplicações biomédicas.

Além disso, há um interesse crescente no uso da lignina como estabilizante de emulsões de Pickering. Bertolo *et al.* 2019 estudaram o uso de nanopartículas de lignina alcalina e organosolve do bagaço de cana. O objetivo foi desenvolver emulsões de Pickering como sistemas de encapsulamento da curcumina e outros compostos

bioativos. Li *et al.*, 2020 utilizaram lignina como estabilizantes de emulsões de Pickering e agente redutor da prata em microcápsulas antibacterianas. Essa estabilização foi confirmada por Dai *et al.* 2019 que também reporta que emulsões obtidas funcionam como liberação termo-controlada para drogas sensíveis a luz e pouco solúveis em água. Já Chen *et al.* 2019 utilizaram a lignina obtida da hidrólise enzimática, sulfometilada e combinada com alquil poliglucosídeo como emulsificante, bloqueador ultravioleta e antioxidante de emulsões para o encapsulamento da curcumina.

2.2.2 Reações de modificação da lignina

A lignina pode ser aplicada sem modificação química em matrizes poliméricas para melhorar ou proporcionar novas propriedades. Já a lignina modificada tem aplicações em um grande número de produtos químicos, insumos e polímeros (LAURICHESSE, AVÉROUS, 2014).

A lignina pode ser incorporada a diversos materiais para melhorar propriedades tais como: atividade antioxidante, proteção da radiação ultravioleta, retardante de chamas e como agente de reforço. No entanto, a imiscibilidade da lignina com alguns termoplásticos reduz seu potencial de aplicação. Desse modo, o desenvolvimento de modificações em sua estrutura favorece uma ampla utilização como biopolímero (KAI *et al.*, 2016).

Segundo KAI *et al.* 2016, a lignina pode sofrer modificação química com ou sem a fragmentação de sua estrutura. No primeiro caso, uma grande variedade de subprodutos tais como baunilha, dimetilsulfóxido, ácido acético, aldeídos dentre outros aromáticos podem ser obtidos. Dentre os processos de despolimerização destaca-se a pirólise, oxidação, hidrogenação, hidrólise, gaseificação e conversão microbiológica.

Quando a matéria-prima é a lignina sem fragmentações, diversos métodos de modificação vêm sendo propostos para introduzir nos grupos reativos na lignina. Desse modo, aumentando a reatividade química e melhorando algumas propriedades físicas. Essas modificações podem ser obtidas através de reações de aminação, nitração, esterificação, fenolação (KAI *et al.*, 2016). Alquilação e alcoilação também são métodos simples usados para modificação da lignina. Além disso, a natureza

essencialmente aromática da lignina a torna um substrato promissor para reações de substituição eletrofílica em aromáticos.

De um modo geral, alcenos e cicloalcenos reagem rapidamente com eletrófilos como brometos. No entanto, a elevada estabilidade do benzeno impede que a reação ocorra nas mesmas condições. Esse obstáculo pode ser removido pela adição de um catalisador como um ácido de Lewis, por exemplo, o AlCl_3 (CAREY; GIULIANO, 2016) (Figura 5).

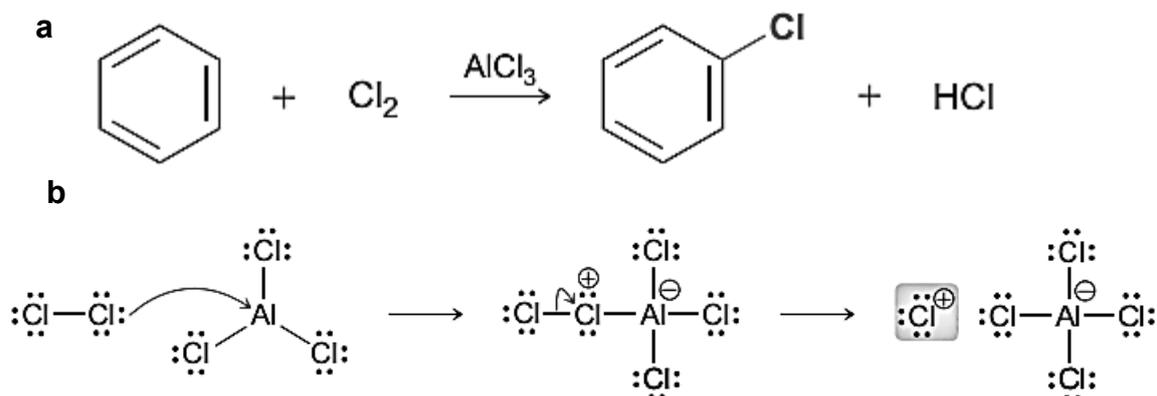
Figura 5 - Reação de bromação do benzeno



Fonte: (CAREY; GIULIANO, 2016)

Nesse caso, o brometo (eletrófilo) substitui um próton aromático. Isso explica o nome desse tipo de reação denominado substituição eletrofílica em aromáticos. Se o brometo for substituído por um cloreto tem-se uma cloração do anel aromático (Figura 6 a). O cloreto reage com o ácido de Lewis para formar um complexo, onde adquire caráter de eletrófilo (Figura 6 b).

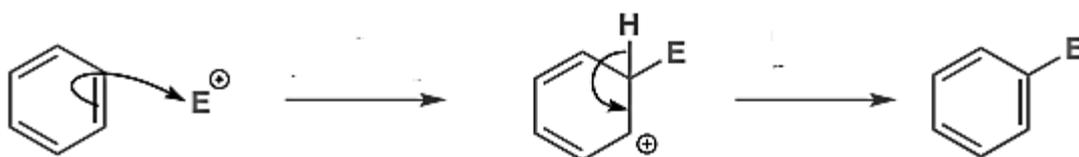
Figura 6 - Reação de cloração do benzeno



Fonte: (CAREY; GIULIANO, 2016)

Esse mecanismo envolve duas etapas. Na primeira, o anel aromático que possui caráter nucleófilo ataca o eletrófilo formando uma ligação com o cloro. Na segunda etapa, ocorre o desprotonamento, restaurando a aromaticidade e regenerando o catalisador (CAREY; GIULIANO, 2016) (Figura 7).

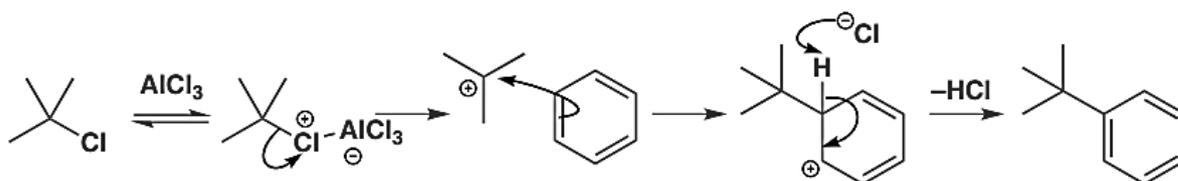
Figura 7- Reação genérica de um eletrófilo (E) com o benzeno



Fonte: (CAREY; GIULIANO, 2016)

Para adicionar um carbocation ao anel aromático, em primeiro lugar é necessário transformá-lo em um eletrófilo ou, em outras palavras, gerar um carbocátion, que usualmente é o cátion terc-butil. Esse tipo de reação é conhecida como alquilação de Friedel–Crafts, na qual o benzeno é tratado com um cloreto de alquila terciário e o ácido de Lewis é o AlCl_3 . A função do AlCl_3 é remover o cloro do cloreto de terc-butila e gerar o cation terc-butil, afim de que seja atacado pelo nucleófilo aromático (CAREY; GIULIANO, 2016) (Figura 8).

Figura 8 - Reação de alquilação de Friedel–Crafts



Fonte: (CAREY; GIULIANO, 2016)

Diversos trabalhos na literatura citam aplicações da lignina através desses tipos de reação. Meng e Weber (2014) relataram que a lignina organossolve reagiu com formaldeído dimetil acetal (FDA) via reação de Friedel – Crafts fornecendo redes microporosas para adsorção de gases como o CO_2 . O uso desse tipo de reação também é descrito por Zhang *et al* (2011), Zhou *et al* (2014) e Zhu *et al* (2019) como forma de alquilar a lignina para aumentar a afinidade e seletividade na remoção de poluentes da água.

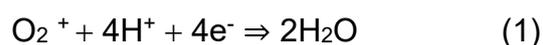
No presente trabalho, as reações de modificação tendo como matéria-prima a lignina visaram principalmente o aumento da atividade antioxidante. Desse modo, o objetivo foi obter um produto com estrutura semelhante ao antioxidante comercial BHT (Figura 9). Dentre os diversos tipos de reações relatadas para a lignina na literatura foi escolhida a alquilação de Friedel–Crafts como a forma mais promissora para aumentar a atividade antioxidante.

2.3 Compostos antioxidantes

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações significativamente retardam ou previnem a oxidação do substrato por inibir as espécies reativas do oxigênio (ERO). Diversos materiais tais como: plásticos, alimentos e diversos produtos industrializados, podem sofrer oxidação, levando à perda das propriedades químicas e físicas. Esse processo pode ser inibido pelo uso de aditivos que prolongam a vida útil desses materiais.

Conforme Moure, Garrote e Domínguez (2017), a deterioração de alimentos e cosméticos está diretamente relacionada com a presença de agentes iniciadores tais como: calor, radicais livres, luz, pigmentos fotossensíveis e íons metálicos. Esses agentes induzem a oxidação de lipídeos que é uma das principais causas da deterioração desses produtos. Além disso, grande parte da problemática do acúmulo de radicais livres estão relacionados com efeitos deletérios no corpo.

Os organismos aeróbicos reduzem quase todo o oxigênio absorvido. A cadeia respiratória fornece quatro elétrons para o oxigênio, que se reduz diretamente à água conforme a equação (1). Os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, fornecidos pelo NADH, FADH e pela ubiquinona ou coenzima Q (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989).



No entanto, uma pequena fração desse oxigênio é reduzida univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, produzindo intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio - ERO, que algumas vezes constituem os radicais livres. (Tabela 1)

Tabela 1 – Espécies reativas de oxigênio (EROs).

Fórmula	Espécies
O_2^{\bullet}	Ânion superóxido ou radical superóxido
HO_2^{\bullet}	Radical perhidroxil
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
OH^{\bullet}	Radical hidroxila
RO^{\bullet}	Radical alcoxil
ROO^{\bullet}	Radical peroxil
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico
O_2	Oxigênio singlete
RO^{\bullet}	Carbonila excitada

Fonte: elaborada pelo autor

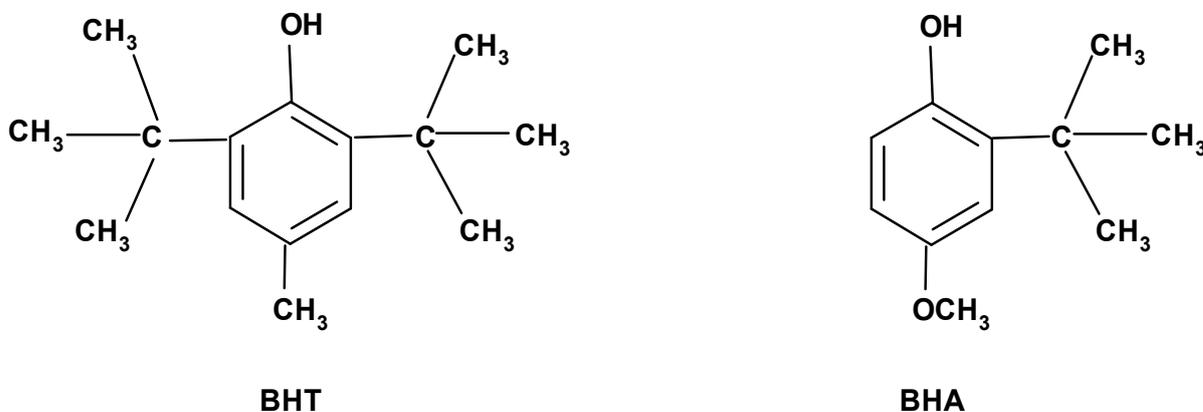
O corpo naturalmente produz espécies EROs que são inativadas pelo sistema de defesa das células. No entanto, em condições de estresse, as espécies ERO excedem a capacidade antioxidante natural do organismo, causando a oxidação de moléculas vitais tais como: lipídeos, proteínas, carboidratos e ácido nucleico. Essa oxidação pode está associada com o surgimento de algumas doenças (COTINGUIBA; SILVA; AZEVEDO, 2013). O combate das espécies EROs ou radicais livres tem-se mostrado como principal alternativa para conter esses processos.

Os radicais livres podem ser qualquer átomo, molécula ou íon que possuem um ou mais elétrons livres na sua distribuição eletrônica mais externa. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados, têm instabilidade elétrica muito grande e, por esta razão, mesmo tendo meia vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa. Podem reagir com qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron desse composto para sua estabilização, independentemente de ser uma molécula, uma célula, ou tecido do organismo. A partir daí, podem acontecer reações em cadeia de lesão celular. Devido a esta característica, é denominado de substância oxidante (COTINGUIBA, SILVA, AZEVEDO, 2013).

O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. Desta forma, a formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois eles são necessários no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias ("usinas energéticas") das células, a fim de gerar o ATP (energia). Os Radicais Livres, produzidos pelos macrófagos e neutrófilos (glóbulos brancos de defesa), também são usados contra bactérias e fungos invasores do organismo, produzindo ação lesiva a estes microrganismos (COTINGUIBA, SILVA, AZEVEDO, 2013).

De acordo com Liu *et al.* (2013), o estresse oxidativo é uma das principais causas de doenças como diabetes, câncer e processos degenerativos do envelhecimento. Os antioxidantes protegem o corpo do dano oxidativo quando inativam parte dos radicais livres (BABU; WU, 2008). O BHT (Butylated hydroxytoluene ou di-*tert*-butil metil fenol) e o BHA (buthylated hydroxyanisole ou 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol) são antioxidantes sintéticos que, embora sejam bastante utilizados, têm o uso restrito pela legislação de diversos países, inclusive a brasileira, devido à suspeita de alguns efeitos tóxicos e carcinogênicos (Figura 9). Em vista disso, tem crescido o interesse por antioxidantes provenientes de fontes naturais, principalmente, resíduos de agroindustriais em diferentes áreas desde a bioremediação até a ciência de materiais nos últimos cinco anos (PANZELLA; NAPOLITANO, 2017). Dentro desse cenário, a lignina tem recebido destaque como composto de atividade antioxidante promissora.

Figura 9 - Estruturas dos antioxidantes BHT e BHA



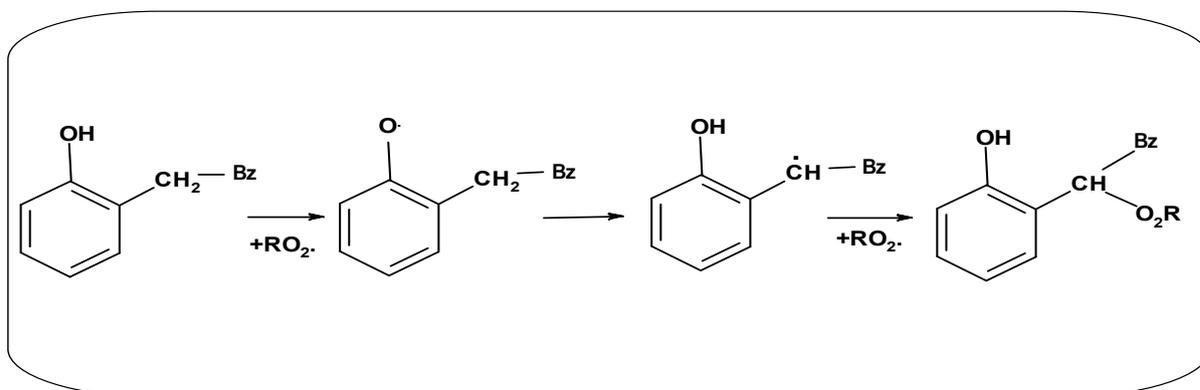
Vinardell *et al.* (2008) relataram que a elevada atividade antioxidante, somada ao fato da lignina não apresentar efeitos nocivos a pele e aos olhos, abre novas perspectivas para fins de cosméticos e aplicações farmacêuticas. Ugartondo *et al.* (2008) obtiveram resultados semelhantes. Conforme Lu e Ralph (2014), a atividade antioxidante está diretamente ligada à pureza da lignina, como também ao número e a posição dos grupos hidroxila doadores de hidrogênio no anel aromático. O método de obtenção também possui influência nas ligninas, quando obtidas a partir de auto hidrólise e processo organossolve apresentam maior teor de grupos fenóis, logo maior poder antioxidante do que ligninas alcalinas.

2.3.1 Mecanismo dos Compostos antioxidantes

Os radicais livres são comumente inibidos por dois mecanismos, transferência de átomos de hidrogênio ou de elétron para converter esses radicais em espécies estáveis. Segundo Dizhbite *et al.* (2004), no mecanismo do radical DPPH a interação ocorre primariamente com os hidrogênios dos grupos das hidroxilas fenólicas presentes nas unidades fenilpropanoides. Além disso, hidrogênios ligados diretamente ao anel aromático e hidrogênios benzílicos também podem ser abstraídos pelo DPPH. Entre os fatores estruturais que contribuem para atividade antioxidante, destacam-se a presença de hidroxilas fenólicas, grupos metoxi na posição orto e para, cadeia propano saturada, cadeia lateral com grupos hidroxila. Já substituições α -carbonil na cadeia lateral e dupla ligação conjugada com o anel aromático reduzem o potencial antioxidante.

Segundo Matsuura e Ohkatsu (1999), o efeito dos substituintes na atividade antioxidante depende da capacidade dos mesmos em doar/retirar elétrons. O aumento da densidade eletrônica no átomo de oxigênio da hidroxila fenólica favorece a taxa de seqüestro de radicais livres. Substituintes terc-butil na posição orto e para são particularmente recomendados, uma vez que o efeito estérico dificulta o acoplamento dos radicais fenoxi formados. Os hidrogênios α dos substituintes orto estabilizam os radicais fenoxis quando são transferidos a estes, regenerando-os a fenol (Figura 10).

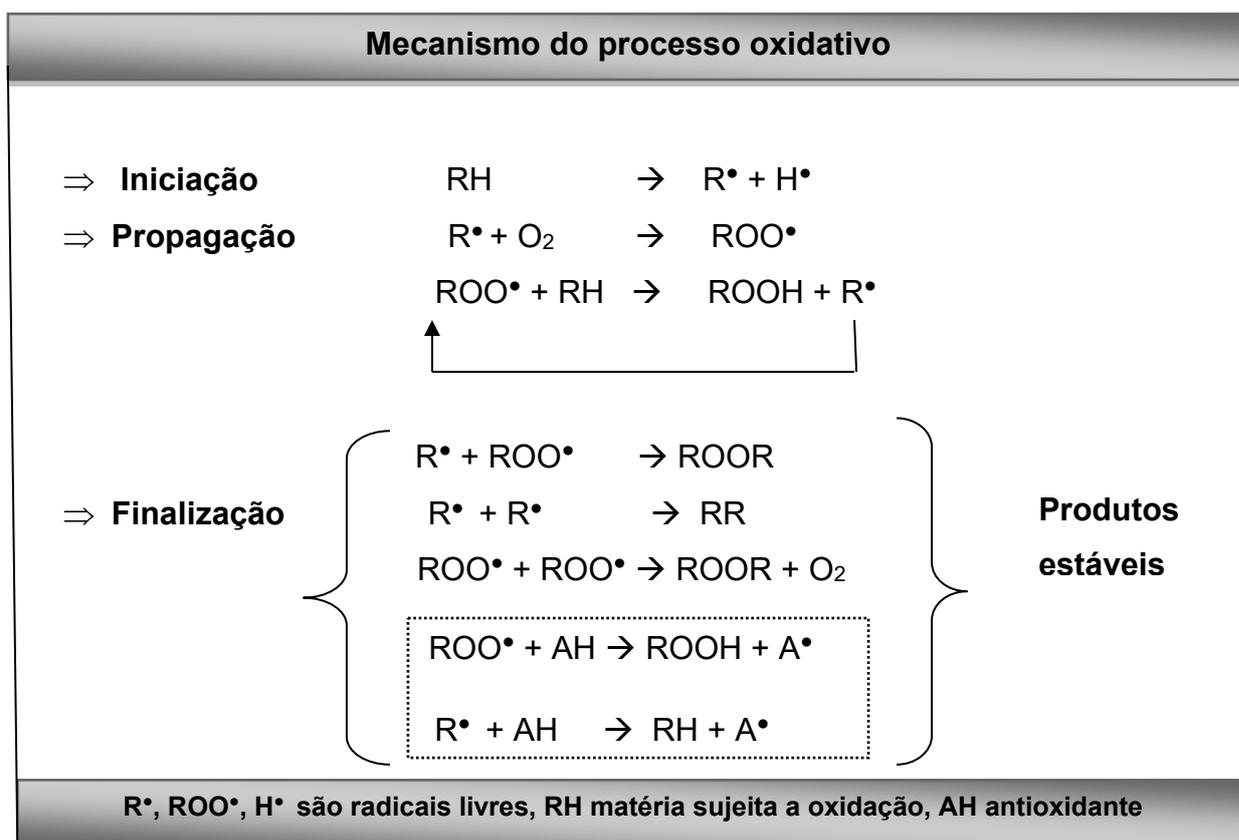
Figura 10- Mecanismo de atuação de um antioxidante. Bz corresponde a um grupo benzil.



Fonte: Matsuura e Ohkatsu (1999)

O mecanismo do processo oxidativo se desenvolve normalmente em três etapas: iniciação, propagação e finalização (Figura 11). Na etapa inicial, uma fonte de energia (luz, calor) promove a quebra homolítica da ligação, produzindo espécies radicalares. Na etapa de propagação, o oxigênio ataca o radical R^\bullet formando o radical peróxido. Na etapa de finalização, dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis.

Figura 11 - Mecanismo do processo oxidativo



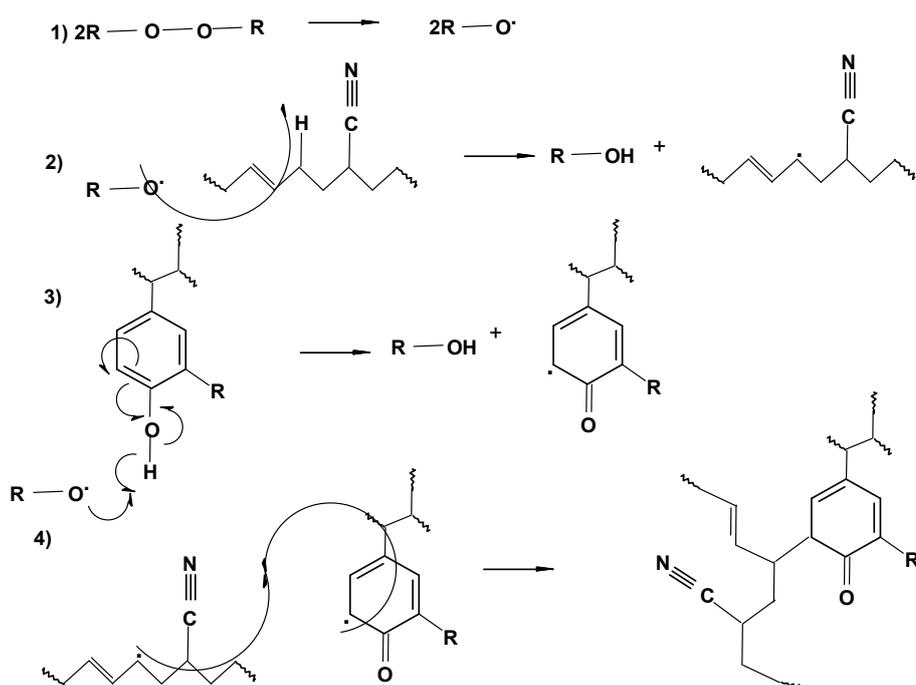
Fonte: elaborada pelo autor

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres R^\bullet e ROO^\bullet com maior facilidade do que os hidrogênios da matéria sujeita a oxidação. Assim, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte (A^\bullet) procedente do antioxidante. Esse radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas.

Os antioxidantes primários (AH) são compostos fenólicos ou tocoferóis que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Já os antioxidantes secundários atuam como agentes quelantes de metais e decompositores de peróxido, os quais retardam ou previnem a oxidação pela supressão dos promotores de oxidação.

Bova *et al.* (2016) sugerem o seguinte mecanismo de atuação de um antioxidante na borracha nitrílica (Figura 12). Na etapa 1, denominada iniciação, os radicais livres são gerados nas cadeias da borracha devido as elevadas temperaturas, severas condições de processamento, ataque de oxigênio molecular e fotodegradação (KOŠÍKOVÁ *et al.*, 2007). Na etapa 2 ocorre propagação e o ataque às cadeias da borracha. Nas etapas 3 e 4 ocorrem a atuação do antioxidante fenólico gerando radicais menos reativos, com posterior enxertia nas cadeias na borracha.

Figura 12- Mecanismo de atuação de um antioxidante na borracha nitrílica



Fonte: Bova *et al.* (2016)

2.3.2 Métodos para determinar atividade antioxidante

Schaich, Tian e Xie (2015) relataram que a descoberta dos benefícios dos antioxidantes para a saúde, levou a uma corrida para determinar quais materiais naturais continham o maior teor de antioxidantes. Concomitantemente, houve um forte apelo de marketing de bebidas, alimentos, aplicações médicas e terapêuticas que faziam uso desses compostos. A popularização dos antioxidantes por sua vez levou a necessidade de desenvolvimento de métodos para determinar a atividade antioxidante, comparar e ranquear diferentes alimentos e produtos naturais.

A grande diversidade química dos antioxidantes torna difícil a tarefa de quantificar e separar individualmente a contribuição de cada componente. Entretanto, a atividade antioxidante total, que considera a cooperação entre todos os antioxidantes da amostra, é muito mais significativa para avaliar os benefícios desses compostos (ÇELIK *et al.*, 2010). Desse modo, uma grande variedade de ensaios foi desenvolvida para determinar atividade antioxidante total. Diversos artigos têm sido publicados comparando os valores da atividade de diferentes alimentos (RUFINO *et al.*, 2011; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015; KHAN *et al.*, 2019; MESELHY *et al.*, 2020) Esses dados servem como base para recomendar quais melhores alimentos para consumir e para o marketing de produtos.

Os métodos antioxidantes variam quanto aos radicais gerados, o mecanismo de atuação e se as medidas são tomadas a determinados valores fixos de tempo ou em um intervalo. Conforme Giada 2014, dentre os métodos para a determinação de antioxidantes *in vitro* existem aqueles baseados na remoção de radicais livres do meio. Os ensaios do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), TEAC/ABTS e ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) são os mais utilizados (Tabela 2).

Tabela 2- Métodos *in vitro* para determinar atividade antioxidante.

Método	Exemplos
Sequestro de Radicais	DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil)
	ABTS (2,20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))
	AAPH (2,29-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) ORAC (oxygen radical absorbance capacity)
Poder redutor	Ensaio Folin-Ciocalteu
	FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro
	CUPRAC (cupric ion-reducing antioxidant capacity)
Potencial de oxidação	Voltametria, amperometria, biamperometria, potenciometria, coulometria
Quelação metálica	Quelação de ferro e íons de cobre
Inibição da oxidação de óleo	Ácido α -linolênico, emulsões

Fonte: Moure, Garote, Domínguez (2017)

Segundo Mishra, Ojha e Chaudhury (2012), o método DPPH é usado corriqueiramente para a determinação da atividade antioxidante de diversos compostos. Quando em solução, o radical DPPH \cdot apresenta coloração violeta-escura. A presença de compostos doadores de átomos de hidrogênio, por exemplo, antioxidantes, reduz o radical DPPH \cdot a DPPH $_2$ que possui cor amarela. O decréscimo da absorvância é medido no espectrofotômetro em 515 nm, servindo como parâmetro para a atividade antioxidante. A estabilidade do nitrogênio presente no DPPH \cdot favorece a reação com diversos antioxidantes regidos por diferentes cinéticas ou simplesmente não ocorre a reação.

Conforme Schaich, Tian e Xie (2015), uma solução concentrada de DPPH tem sua absorvância inicial (A_0) medida em 515 nm, logo em seguida um suposto antioxidante é misturado. A absorvância final (A_f) é medida nas mesmas condições transcorrida uma faixa de tempo que varia de 4 minutos até alguns dias. A diferença

entre essas absorvâncias gera valores para classificar os supostos compostos com atividade antioxidante. O método DPPH é feito em meio hidrofóbico e desse modo deve ser realizado em solventes orgânicos. Embora o mecanismo principal seja a transferência de hidrogênios (HAT), solventes que dificultam esse processo favorecem transferência de elétrons (SET). Um outro método antioxidante bastante utilizado é o ABTS.

Duas abordagens para o método TEAC/ABTS são descritas na literatura (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015, NENADIS *et al.* 2004). Na primeira, o radical hidroxil (HO.) é produzido a partir da reação da metamioglobina (meta-mgb) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Uma vez produzido, esse radical oxida o 2,2'-azinobis (3 etilbenzotiozolino-6-ácido sulfônico) (ABTS) para sua forma de radical livre (ABTS.+), que possui coloração azul-esverdeada. Compostos antioxidantes, por sua vez, podem reduzir o radical (ABTS.+), e ocasionar a perda da coloração, o que é uma das principais características do método. Entretanto, os resultados obtidos são superestimados devido ao fato do antioxidante não reagir apenas com o radical (ABTS.+), mas também com o radical hidroxil (HO.) e a metamioglobina (meta-mgb).

Afim de reverter esse obstáculo do método, Re *et al.* (1999) sugeriram que o radical (ABTS.+), fosse produzido pela reação de oxidação com persulfato de potássio, antes de reagir com o composto antioxidante. Desse modo, a redução da cor do radical é acompanhada pela diminuição da absorvância a 734 nm. Esse método pode ser usado tanto para compostos solúveis em água como em solventes orgânicos.

Segundo Santos *et al.* (2003), o método TEAC/ABTS (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) avalia a habilidade relativa das substâncias supostamente antioxidantes em descolorir o cátion radical 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiozolino-6-ácido sulfônico) (ABTS.+), através da sua captura. O antioxidante sintético Trolox® (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), um análogo da vitamina E, solúvel em água, é usado como padrão de comparação. A atividade dos compostos testados é expressa em valores TEAC, que é definido como a concentração de Trolox® que possui a mesma atividade que 1 mmol/L da substância antioxidante investigada.

Moure, Garote, Domínguez (2017) relataram que além destes métodos, existem outras técnicas não-radicalares baseadas em potencial redox, que também

servem como um indicador de atividade antioxidante. Basicamente, o método fundamenta-se nas reações redox que ocorrem entre as substâncias em estudo e metais, tais como: ferro, cobre, cromo, cério, etc. Quando o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} em meio ácido denomina-se ensaio de poder antioxidante pela redução férrica (FRAP). Esse é um método simples, rápido e de baixo custo. Caso o ferro seja substituído pelo cobre o ensaio é denominado de capacidade antioxidante redutora cúprica (CUPRAC) que mede a eficácia dos antioxidantes em converter Cu^{2+} a Cu^+ .

O teor de fenólicos total é um ensaio simples, reproduzível e amplamente utilizado, fundamentado na redução do reagente Folin-Ciocalteu por compostos fenólicos em meio alcalino. Os métodos eletroquímicos, por sua vez, são sensíveis, rápidos e simples em medir a capacidade dos antioxidantes em doar elétrons. Segundo Mareček *et al.* (2017), embora os diversos métodos antioxidantes venham sendo estudado exaustivamente pela literatura, nenhum único método pode ser indicado como o mais eficiente para determinar atividade antioxidante.

A atividade antioxidante deve ser determinada por diferentes métodos que utilizam mecanismos variados. Entretanto, a interpretação e comparação dos resultados obtidos através dessas metodologias pode não ser tão simples. A fim de superar esses obstáculos o trolox® (um análogo hidrossolúvel da vitamina E) é geralmente usado como antioxidante padrão nos diferentes métodos. Desta forma, para efeito de comparação, os resultados dos diferentes métodos podem ser expressos em equivalentes de trolox® (GIADA., 2014).

Considerando que esse trabalho se propõe a avaliar a aplicação da lignina alquilada em emulsões de Pickering. Na próxima seção alguns aspectos desse tipo de emulsão serão considerados.

2.4 Emulsões Pickering

Emulsões são compostas por uma fase dispersa em outra fase contínua. Geralmente, as substâncias que formam essas fases não se misturam, desse modo moléculas de emulsificantes que possuem extremidades com afinidade em ambas as fases são necessárias para promoverem a estabilidade da emulsão. Emulsificantes são continuamente adsorvidos e desorvidos na interface da emulsão, sendo esta a origem do fenômeno da separação de fase, uma vez que ocorre a competição entre adsorção e coalescência e conseqüentemente na estabilidade da emulsão (KALASHNIKOVA *et al.*, 2013). A estabilidade de uma emulsão refere-se ao tempo

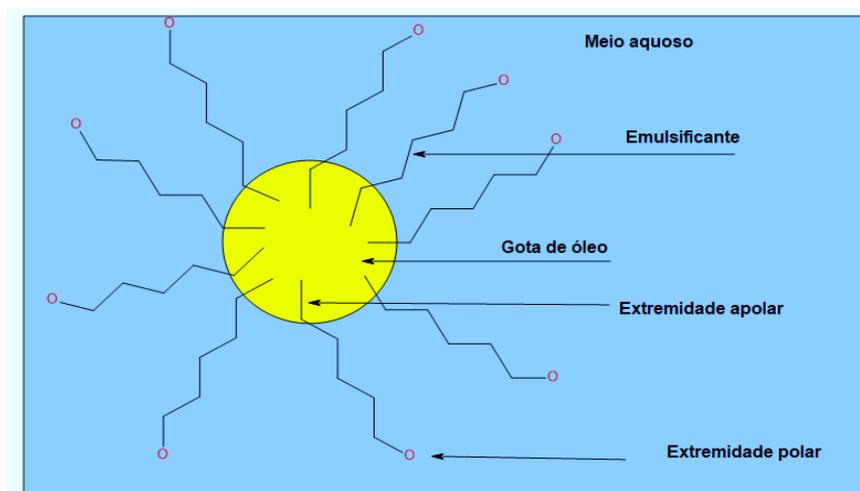
necessário para o início visual da separação de fases, esse intervalo pode variar desde minutos até anos e como regra geral tem-se que emulsões muito estáveis levam bastante tempo para separação de fases (FRANZOL, REZENDE, 2015).

As emulsões mais clássicas são formadas pela mistura óleo e água, os emulsificantes dispersam as moléculas de óleo em forma de gota ou glóbulos na água. A extremidade polar do emulsificante, por ter mais afinidade, fica em contato direto com a água, enquanto o óleo fica em contato com a parte apolar no interior da gota (FRANZOL; REZENDE, 2015) (Figura 13). A estabilidade de uma emulsão refere-se ao tempo necessário para o início visual da separação de fases. Esse intervalo pode variar desde minutos até anos. Como regra geral tem-se que emulsões muito estáveis levam bastante tempo para separação de fase, que se inicia com o processo de coalescência das gotas. (FRANZOL; REZENDE, 2015).

As emulsões podem ser classificadas em simples e múltiplas. Gotas de óleo dispersas em água formam emulsões simples, óleo/água, leite, iogurte, cremes, molhos para saladas, maionese, sorvetes e sopas também são exemplos desse tipo de emulsão. Já a emulsões múltiplas são sistemas que aparentam ter uma única fase, porem são formados por três diferentes fases. A mistura de água/óleo/água são exemplos desse tipo de emulsão (PEREIRA, GARCIA-ROJAS, 2015).

Emulsificantes são moléculas anfipáticas, ou seja, que possuem uma extremidade polar e outra apolar. Em uma mistura óleo e água, os emulsificantes dispersam as moléculas de óleo em forma de gota ou glóbulos na água. A extremidade polar do emulsificante por ter mais afinidade fica em contato direto com a água enquanto o óleo fica em contato com a parte apolar no interior da gota (Figura 13).

Figura 13 - Ilustração dos principais componentes de uma emulsão.

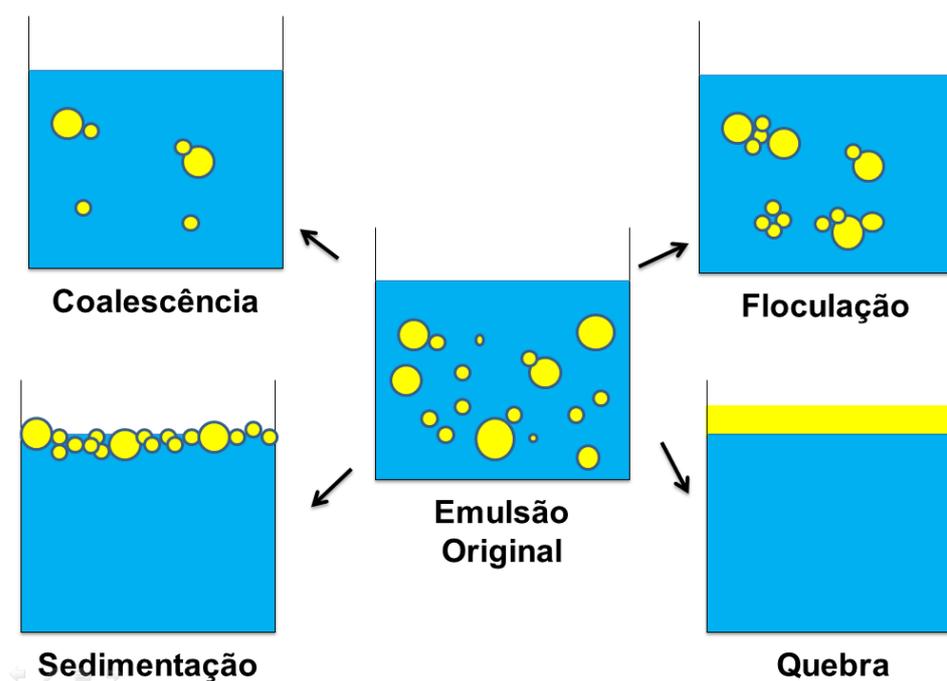


Fonte: elaborada pelo autor

A coalescência de uma emulsão ocorre por junção de duas ou mais gotículas que entram em colisão, de modo que elas se fundem diminuindo o número de bolhas, mas com aumento do diâmetro. O aumento da temperatura favorece esse processo uma vez que aumenta o número de choques moleculares. As colisões entre gotas podem não levar a coalescência, permanecendo na etapa de floculação. Quando a fase dispersa se torna contínua sendo separada do resto da emulsão por uma única interface, tem-se a emulsão totalmente separada (quebra). Em uma emulsão também pode ocorrer sedimentação, processo no qual ocorre uma diferença de densidade entre duas fases, com uma das fases assumindo o topo da emulsão (FRANZOL; REZENDE, 2015). Dentre os tipos de emulsões, as de Pickering tem recebido crescente atenção nos últimos anos (Figura 14).

Uma emulsão de *Pickering* dispensa o uso de emulsificantes, uma vez que são estabilizadas por partículas sólidas que adsorvem nas interfaces da emulsão irreversivelmente. Em uma mistura água e óleo, as gotas de óleo são formadas e dispersas na água. Eventualmente, as gotículas se unirão para diminuir a quantidade de energia no sistema. As partículas sólidas presentes se ligarão à superfície da interface e evitarão que as gotículas se unam, aumentando assim a estabilidade da emulsão (EMULSÕES, 2019).

Figura 14 – Uma emulsão pode sofrer separação pelos processos de coalescência, floculação, sedimentação e quebra.



Fonte: FRANZOL e REZENDE (2015) (adaptado pelo autor)

Segundo Chevalier e Bolzinger (2013) a ausência de emulsificante favorece a formulação de produtos para os quais o uso de surfactantes tem efeitos negativos, tais como irritação, citotoxicidade e comportamento hemolítico, tendo aplicações em produtos farmacêuticos, liberação controlada de substâncias, cosméticos e sistemas de encapsulamento. Emulsões farmacêuticas podem ser usadas como veículos para diferentes formas de administração tais como: injeção, oral, aplicação tópica, ocular, pulmonar e nasal. O principal objetivo desses tipos de emulsão é a proteção, aumento da solubilidade e bioavaliabilidade dos ingredientes farmacêuticos ativos (ALBERT *et al.*, 2019). As emulsões de Pickering são muito mais estáveis do que as estabilizadas por emulsificantes tradicionais, isso ocorre porque o revestimento de gotículas por partículas sólidas funciona como uma rígida barreira mecânica contra coalescência.

Partículas sólidas na escala dos micrometros (10^{-6} m) podem estabilizar grandes gotas, que podem atingir até alguns milímetros. Inclusive esse fato é um dos diferenciais das emulsões de Pickering em relação às emulsões clássicas (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013). Assim como no caso dos emulsificantes, a estabilidade da emulsão se dá pela adsorção de partículas sólidas na superfície das gotas. No entanto, não há necessidade das mesmas terem polaridades diferentes, uma vez que a interação parcial (molhabilidade parcial) das partículas com ambas as fases da emulsão é responsável pelas fortes forças de adsorção. Essas forças superam inclusive o grau de agitação causado pela energia térmica nas moléculas.

Emulsões de Pickering possuem aplicações em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. As partículas sólidas usadas para estabilizar essas emulsões devem preferencialmente serem derivadas de fontes naturais e abundantes como a biomassa (TAN *et al.*, 2012).

2.4.1 Celulose Bacteriana

A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza. Pode ser obtido das plantas, tunicados e produzidos por bactérias. Nesse caso recebe a denominação de celulose bacteriana. Esse tipo de celulose possui elevada cristalinidade e pureza devido à ausência de lignina e hemiceluloses, inerentemente, associadas nas plantas. Além disso, possui excelentes propriedades mecânicas e biocompatibilidade (PAXIMADA *et al.*, 2016).

As fibras de celulose podem ser tratadas com ácidos fortes para remover as regiões amorfas. Desse modo, obtendo-se a celulose cristalina em forma de bastões denominados nanocristais de celulose bacteriana (VASCONCELOS et al., 2017). A celulose não possui odor, gosto é relativamente não tóxica e não irritante sendo usada em alimentos e produtos farmacêuticos (ALBERT *et al.*, 2019). O caráter anfifílico desse tipo de celulose permite seu uso como surfactantes na estabilização de emulsões de Pickering (YAN et al., 2017). Além disso é interessante que as nanofibrilas de celulose estejam bem dispersas no meio.

Saito et al. (2007) relataram que para evitar a agregação de nanofibrilas de celulose em água algumas modificações são necessárias. Dentre elas destaca-se a oxidação mediada por TEMPO, que oxida as hidroxilas primárias em ácidos carboxílicos ou aldeídos na superfície da nanofibrila. Esse processo reduz a agregação tanto pelas repulsões geradas pelos grupos carboxilato, bem como através da diminuição de ligações de hidrogênio entre as nanofibras, uma vez que reduz o número de hidroxilas (BENHAMOU *et al.*, 2014). Como excipiente farmacêutico a celulose é usada para formulações orais, tópicas, em menor proporção aplicações oftalmológicas, injetáveis e inaláveis (ALBERT *et al.*, 2019).

2.4.2) Aplicações de emulsões Pickering de Cosméticos

Segundo Baki e Alexander (2015), cosméticos são produtos destinados a serem de aplicados de diversas maneiras ao corpo tendo como objetivo a limpeza, embelezamento, promoção da atratividade ou alteração da aparência. Dentre eles podem ser citados como exemplos hidratantes, batons, esmaltes para unhas, maquiagem facial e olhos, xampus, tinturas de cabelos, desodorantes, etc.

Grande parte desses produtos são formulados como emulsões. Em vista disso, as emulsões de Pickering encontram um cenário promissor a sua aplicação. Uma vez que a ausência de surfactantes a torna essas emulsões mais biocompatíveis e estáveis. Além disso, as emulsões de Pickering podem atuar como carregadores de fármacos aumentando a estabilidade de compostos bioativos bem como sua dispersibilidade em produtos para pele (WEI et al., 2020). Para esses fins as partículas que estabilizam as emulsões de Pickering devem ser preferencialmente derivadas de

polímeros naturais. Isso porque os baixos custos de obtenção favorecem aplicações em escala industrial (KUSUMAWATI, INDRAYANTO., 2013).

Conforme Yan et al. (2017) o uso de celulose bacteriana como emulsificante natural do azeite de oliva. Amplia as aplicações das emulsões de Pickering em alimentos, cosméticos e produtos médicos.

3 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar e avaliar a aplicação e citotoxicidade da lignina acetossolve alquilada obtida do resíduo do dendê como antioxidante em emulsões do tipo de Pickering.

3.1 Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar a lignina da torta do dendê obtida pelo processo acetossolve e com etapa de auto hidrolise como pré-tratamento;
- Relacionar as características de cada tipo de lignina com os métodos de extração;
- Realizar reações de alquilação que visem o aumento da atividade antioxidante das ligninas obtidas;
- Caracterizar os produtos alquilados por diferentes métodos de análise;
- Avaliar a atividade antioxidante da lignina e dos produtos alquilados por diferentes métodos;
- Produzir emulsão de Pickering com a lignina e os produtos alquilados;
- Avaliar a estabilidade das emulsões de Pickering ao longo do tempo de armazenamento;
- Comparar a citotoxicidade das emulsões de lignina, dos produtos alquilados e do BHT;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- ❖ ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]
- ❖ Acetato de etila (C₄H₈O₂)
- ❖ Ácido acético (C₂H₄O₂)
- ❖ Ácido bórico (H₃BO₃)
- ❖ Ácido clorídrico (HCl)
- ❖ Alamar Blue ®
- ❖ Anidrido acético (C₄H₆O₃)
- ❖ Azeite de oliva extravirgem
- ❖ Brometo de sódio (NaBr)
- ❖ Brometo de potássio (KBr)
- ❖ Células HaCat (queratinócitos humanos)
- ❖ Cloreto de alumínio (AlCl₃)
- ❖ Cloreto de ferro (III) (FeCl₃ • 6H₂O)
- ❖ Cloreto de Terc-Butila (C₄H₉Cl)
- ❖ 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (*DPPH* •)
- ❖ 1,4 dioxano (C₄H₈O₂)
- ❖ Dihidrogenofostafo de sódio (NaH₂PO₄)
- ❖ Dimetilsulfóxido (C₂H₆OS)
- ❖ Fenolftaleína (C₂₀H₁₆O₄)
- ❖ Hexano (C₆H₁₄)
- ❖ Hidróxido de sódio (NaOH)
- ❖ 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox ®)
- ❖ Hipoclorito de sódio (NaClO)
- ❖ Meio de cultura celular (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1mM de piruvato e 1% de penicilina-estreptomicina).
- ❖ Persulfato de potássio 140 mM (K₂S₂O₈)
- ❖ Piridina (C₅H₅N)
- ❖ Sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄)
- ❖ Tampão acetato
- ❖ N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO)

- ❖ *Tetrahidrofurano- THF*
- ❖ 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ)

4.2 Preparo da matéria-prima

A torta de dendê (fibras do mesocarpo prensado) foi fornecida pela Embrapa Amazônia Oriental, localizada no Pará. As fibras foram moídas em moinho de facas FRITSCH pulverisette 19 e selecionadas em uma peneira com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. As fibras moídas foram submetidas a uma peneira granulométrica durante 15 minutos usando uma amplitude de vibração de 2 mm, a fração menor que 60 µm foi recolhida.

4.3 Caracterização da matéria-prima

Foram analisados o teor percentual de umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose e alfa-celulose do pó e da fibra da torta de dendê, segundo Moraes *et al.* (2010).

4.4 Extração da lignina acetossolve (L)

4.4.1 Sem pré-tratamento de auto hidrólise (L)

A lignina acetossolve (L) foi obtida conforme a metodologia proposta por Benar (1992). Em com sistema de refluxo, 10 g de fibra de dendê obtida na etapa 4.1 de preparo da matéria-prima foram adicionados a uma solução de 93%(m/m) de ácido acético, 0,3%(m/m) de ácido clorídrico e 7% de água, relação amostra/solvente 1/7 (m/m) reagiu durante 3 horas a 115 °C.

Após decorrido esse tempo a mistura foi filtrada em papel de filtro de 28 µm de abertura. A fração solúvel obtida corresponde ao licor negro. A fração fibrosa foi lavada com ácido acético p.a. (99,7%, m/m) à quente, até que o líquido de lavagem das fibras ficar incolor. Os licores de lavagem foram reunidos e armazenados. Posteriormente, o licor negro foi concentrado em um rota-evaporador e precipitado com água destilada, na razão de 1:10 (v/v), e reservado por 24 horas, filtrado em papel de filtro de 8 µm de abertura, lavado com água destilada até pH=7 e seco até peso constante em estufa.

4.4.2 Com pré-tratamento de auto hidrólise (LA)

Aproximadamente 20 g de fibras obtidas na etapa 4.1 do preparo de matéria-prima foram misturadas com 200 mL de água destilada em um vaso de Teflon de 500 mL, aquecido a 180 °C por 90 min, em um reator de marca Berghof, modelo Highpreactor BR-300. O reator foi controlado automaticamente por um dispositivo de controle de temperatura da marca Berghof, modelo BTC-3000, equipado com termostato PID (Photoionization Detector).

O material obtido foi filtrado e lavado com aproximadamente 1 L de água destilada. As fibras foram secas em estufa. O restante do processo foi realizado conforme o tópico 4.41 (Figura 15). A massa de lignina na fibra foi determinada conforme Equação (2):

$$MLF = \frac{\%L \times MMI}{100} \quad (2)$$

Onde:

MLF: é a massa de lignina teórica em grama (se o rendimento fosse 100%)

%L: é a porcentagem de lignina na fibra

MMI: é a massa da matéria-prima inicial em g

O rendimento de lignina em porcentagem é dado pela equação (3):

$$RL\% = \frac{100 \times MLO}{MLF} \quad (3)$$

onde:

RL% é o rendimento de lignina em porcentagem

MLO é a massa de lignina obtida após a extração (rendimento experimental)

O rendimento da matéria-prima obtida após a auto hidrólise é dado pela Equação (4):

$$RA\% = \frac{(MMI - MMA) * 100}{MMA} \quad (4)$$

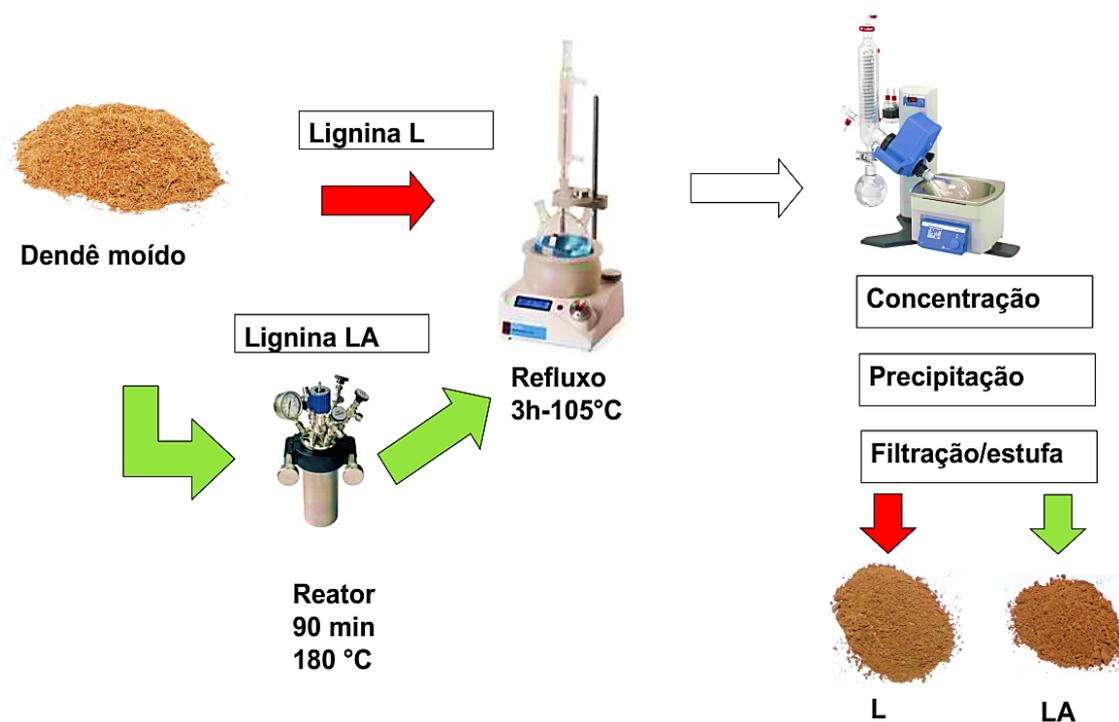
Onde:

RA% é rendimento da matéria-prima obtida após a auto hidrólise em porcentagem

MMI: é a massa da matéria-prima inicial em g

MMA: é a massa da matéria-prima após a auto hidrólise

Figura 15 - Processo de obtenção da Lignina (L) e (LA)



Fonte: elaborada pelo autor

4.5 Nanofibrilas de celulose

4.5.1 Celulose Bacteriana

A matéria-prima foi obtida do processamento de celulose bacteriana produzida pela bactéria *Komagataeibacter xylinus* 53582 em meio alternativo (melaço

de soja hidrolisado) fornecida pela Embrapa. Após período de incubação de 10 dias após inócuo, as películas obtidas foram lavadas com água (80°C, 1h, 2x) e com NaOH (4,0% m/v, 80°C, 1h, 2x) para remoção do meio de cultura e desconstruídas em Cúter de mesa (Robot–Coupe, França).

4.5.2 Nanofibrilas de celulose bacteriana oxidada (CBNOX)

O material desconstruído foi submetido à oxidação mediada por TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical). O material processado foi adicionado à água destilada, NaBr, catalisador radical TEMPO e NaClO, seguindo a metodologia de Saito *et al.* (2007), e agitado a temperatura ambiente por 150 min. A mistura foi lavada com ajuda de centrifuga (12.500 rpm, 4°C; Hitachi Koki himac CR22GIII, Japão) três vezes. O material obtido foi diluído para a concentração de 1,0% (m/m) e nanofibrilado em moinho colidal por 10 min.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE

4.6.1 Determinação do Teor de Carboxilato

Uma amostra de 1 g celulose foi misturada em 15 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L. Após 30 min de agitação magnética a mistura foi titulada com NaOH 0,04 mol/L. O teor de carboxilato foi dado pela equação (5):

$$n(\text{COOH}) = \frac{(V_2 - V_1) \times C_{\text{NaOH}}}{m_{\text{celulose}}} \quad (5)$$

onde:

$n(\text{COOH})$ é o conteúdo de carboxilato (mmol/g celulose)

V_2 volume é o correspondente ao teor de carboxilato

V_1 volume é o correspondente ao ácido clorídrico

C_{NaOH} é a concentração de NaOH usada na titulação

m_{celulose} é a massa de celulose

4.6.2 Determinação do Potencial Zeta

O potencial Zeta foi realizado em um ZETASIZER Nano-ZS (Malvern) com diluição 1:100 das suspensões em água destilada.

4.7 Caracterização das ligninas acetossolve

4.7.1 Determinação de hidroxilas fenólicas

As hidroxilas fenólicas foram quantificadas conforme a metodologia descrita por Goldmann *et al.* (2017) com adaptações. Uma solução tampão pH =12 foi preparada dissolvendo-se 12,4 g de ácido bórico (H_3BO_3) em dois litros de uma solução 0,1 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH). Para a solução tampão pH = 6,5 de dihidrogenofostato de sódio (NaH_2PO_4) foi misturado com 113 mL de uma solução de 0,1 mol/L hidróxido de sódio e diluído para dois litros com água destilada.

Em seguida 0,1 g das amostras de lignina L e LA foram dissolvidas em 100 mL da solução tampão pH=12. Retirou-se 2 mL da solução e dissolveu-se em 50 mL da solução tampão pH=12. A absorbância foi medida em relação à da solução tampão pH=6 no intervalo de 190 a 400 nm.

O teor de hidroxilas fenólicas da amostra de lignina foi calculado usando a absortividade ($\Delta\alpha_{m\acute{a}x}$), a qual é obtida dividindo-se a absorbância pela concentração da solução diluída em gramas por litro. Equação 6 foi utilizada para o cálculo do teor de hidroxilas fenólicas:

$$OH_{fenolico} = \frac{\alpha_{m\acute{a}x}}{4100} \quad (6)$$

OH fenólico: teor de hidroxilas fenólicas em mmol/g.

$\Delta\alpha_{m\acute{a}x}$: diferença entre as absortividades máximas em g/L.

4100 é a diferença entre as absortividades molares máximas para os compostos modelos fenólicos utilizados por Goldmann *et al.* (2017)

4.7.2 Determinação do teor de hidroxilas totais

O teor de hidroxilas totais foi determinado por metodologia descrita por Gosselink *et al.* (2004) com adaptações. A mistura acilante foi preparada pela adição de 200 g (203,6 mL) de piridina (C₅H₅N) em 15,5 mL de anidrido acético (C₄H₆O₃).

Em um balão de fundo redondo e boca esmerilhada foi adicionada 25 mL da mistura acilante e 0,5 g das ligninas L e LA. O balão foi conectado a um sistema de refluxo e mantido por uma hora a 60 °C com agitação magnética. Decorrido esse tempo o balão foi esfriado até a temperatura ambiente, adicionado mais 25 mL de piridina, 50 mL de água destilada e 3 gotas de fenolftaleína. Em seguida, essa mistura foi titulada potenciometricamente com NaOH 1,00 mol/L padronizado previamente até atingir o pH= 8,4 (mudança de coloração da fenolftaleína). A reação envolvida nesta titulação constitui-se em uma reação de neutralização de carboxilas e de fenóis. Os experimentos foram realizados em duplicata e o branco foi preparado seguindo o mesmo procedimento sem adição da amostra.

O teor de hidroxilas totais, OH totais (mmol de OH/g de amostra), foi calculado conforme Equação 7.

$$\text{OH}_{\text{totais}} = \frac{(\text{V}_a - \text{V}_b) \cdot f}{m} + \text{IC} \quad (7)$$

V_b : volume de NaOH, em mL, gasto na titulação do branco;

V_a : volume de NaOH, em mL, gasto na titulação da amostra;

f : concentração da solução de NaOH padronizada em mol/L;

m : massa da amostra de lignina em gramas;

IC : índice de grupos carboxila da amostra.

4.7.3 Determinação do teor de grupos carboxila

Para o teor de grupos carboxila foi utilizada metodologia descrita por Gosselink *et al.* (2004) com adaptações. Em um béquer, 0,1 g de lignina foi misturado a 100 mL de uma solução de NaOH 0,1 mmol/L. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 3 h a temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 12 com uma solução de NaOH 0,1 mol/L e a solução foi titulada potenciometricamente com HCl 0,1 mol/L

padronizado até pH= 8,4. Os experimentos foram realizados em duplicata e o branco seguiu o mesmo procedimento sem adição da amostra.

O teor de grupos carboxila, IC (mmol de COOH/g de amostra), foi calculado conforme a equação 8.

$$IC = \frac{(V_b - V_a) \cdot f}{m} \quad (8)$$

Onde:

V_b : volume de HCl, em mL, gasto na titulação do branco;

V_a : volume de HCl, em mL, gasto na titulação da amostra;

f : concentração da solução de HCl padronizada em mol/L;

m : massa da amostra de lignina em gramas.

4.8 Obtenção das ligninas modificadas pela reação de alquilação (P, PA)

A lignina modificada foi obtida através de uma reação de alquilação de Friedel-Crafts utilizando a metodologia proposta por Zhang *et al.* (2011) com modificações. O cloreto de terc-butila (C₄H₉Cl) foi usado como agente alquilante. Uma vez que a adição dos grupos terc-butila ao anel aromático favorecem o aumento da atividade antioxidante, conforme já observado no antioxidante comercial BHT.

Inicialmente, 200 mg das amostras de lignina (L) e (LA) foram misturadas em 7 mL de cloreto de terc-butila e o catalisador cloreto de alumínio em um balão de fundo redondo e boca esmerilhada que foi acoplado a um sistema de refluxo sob agitação magnética mantido a 65 °C durante 6 h (Tabela 3). Decorrido o tempo de reação, o balão foi resfriado a temperatura ambiente, adicionou-se 40 mL de acetato de etila (C₄H₈O₂) e transferiu-se o conteúdo do balão para um funil de separação. Em seguida três lavagens com 60 mL de água destilada foram efetuadas sempre agitando o funil de separação a fim de separar a fase aquosa. O sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foi usado para retirar a água restante da fase orgânica, seguido de filtração a vácuo com papel de filtro. O solvente foi recuperado em um evaporador rotativo e a

parte concentrada foi seca em estufa a 80 °C durante 8 h. As amostras foram denominadas de acordo com a porcentagem de catalisador (Tabela 3).

Tabela 3 – Denominação das ligninas acetossolve após a reação de alquilação

Matéria-prima	Produto	% Catalisador
L^a	P-10	10
L	P- 15	15
L	P-20	20
LA^b	PA-10	10
LA	PA-15	15
LA	PA- 20	20

^a lignina acetossolve sem auto hidrólise, ^b lignina auto hidrolisada acetossolve

Fonte: elaborada pelo autor

4.9 Remoção de extrativos da matéria-prima e produtos

A matéria-prima e os produtos foram submetidos a extração por Soxhlet com hexano. A um balão de vidro, foram adicionados 150 mL do solvente, e conectado ao extrator. O conjunto balão-extrator foi colocado em uma chapa aquecedora e conectado ao condensador. O número de refluxos foi ajustado para 24 no período de extração. A denominação das amostras sem extrativos foi feita com acréscimo da letra E, ex. LE (Tabela 4). Foram removidos os extrativos as amostras (ver apêndice A):

- 1) L: lignina acetossolve sem auto hidrólise
- 2) LA: lignina acetossolve com auto hidrólise
- 3) P-10: lignina acetossolve sem auto hidrólise, alquilada com 10% de catalisador
- 4) PAE-20: lignina acetossolve com auto hidrólise, alquilada com 20% de catalisador

Essas amostras foram selecionadas tendo em vista que foram as mais promissoras do ponto de vista da atividade antioxidante.

Tabela 4 – Nomenclatura para as amostras desengorduradas

Matéria-prima	Produto	% Catalisador
LE ^a	PE-10	10
LE	PE- 15	15
LE	PE-20	20
LAE ^b	PAE-10	10
LAE	PAE-15	15
LAE	PAE- 20	20

^a lignina acetossolve sem extrativos, ^b lignina auto hidrolisada acetossolve sem extrativos

Fonte: elaborada pelo autor

5 MÉTODOS GERAIS DE CARACTERIZAÇÃO

5.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas para caracterizar e comparar as estruturas das ligninas e dos produtos alquilados. Os espectros de RMN das amostras de lignina e dos produtos foram obtidos em um equipamento Bruker Avance DPX 300 foi utilizado uma sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,0 T, operando em frequências de 300,13 MHz para hidrogênio e 75,33 MHz para carbono. Para os experimentos bidimensionais foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente de campo, posicionado no eixo z e magnitude de 10 A. Os valores de J utilizados para os experimentos pertinentes foram $1J_{\text{H,C}} = 145$ $nJ_{\text{H,C}} = 7$, onde $n \geq 2$.

Os experimentos HSQC foram adquiridos 64 transientes, com um tempo de espera em cada aquisição de 0,28 s, janela em F1 de 222 ppm e em F2 de 24 ppm, com números de pontos em F1 de 256. Os sinais do DMSO, com o ^1H em 2,5 ppm e o ^{13}C em 39,51, foram utilizados como referência para a atribuição dos sinais. As amostras foram preparadas dissolvendo-se 30 mg em 0,5 mL de uma solução de DMSO- d_6 e piridina- d_5 na razão de 4:1 (v/v), com auxílio de um banho ultrassônico durante 24 h. Os espectros bidimensionais obtidos foram processados no programa MestRenova 6.0 usando apodização sine square 90 deg, phase correction manual, smoothing método whittaker smoother fator 25 nos eixos F1 e F2.

5.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A análise foi realizada usando um cromatógrafo LC-20 AD (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector de índice de refração (Shimadzu RID-10A) e THF 55 (grau HPLC) como fase móvel. O fluxo de 1 mL min^{-1} em uma coluna Phenogel 100 Å (7,8 x 300 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). A temperatura da análise foi de 40 °C. A matéria-prima e os produtos foram solubilizados em tetrahidrofurano (THF). Para a construção da curva de calibração, foram utilizados seis padrões de poliestireno 376, 672, 1100, 2380, 5440, 9950 e 1130 Da (Phenomenex ALO-2761). Foram injetadas as amostras LE, PE-10, LAE e PAE-20.

5.3 Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa

O teor de ácidos graxos foi determinado segundo metodologia proposta por Instituto Adolfo Lutz (2005) realizada em um CG/MS QP2010 (Shimadzu, Japão) equipado com uma coluna capilar Rtx-5MS de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e espessura de 0,25 μm . O hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 5,0 mL min^{-1} . A taxa de fluxo de purga foi de 3,0 mL min^{-1} e a velocidade linear de 36,3 cm s^{-1} . A temperatura variou, a uma taxa de 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, entre 50 a 270 $^{\circ}\text{C}$ (temperatura mantida por 20 minutos). Em seguida houve aquecimento até 300 $^{\circ}\text{C}$ a taxa de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A temperatura do injetor foi de 250 $^{\circ}\text{C}$ e interface de fonte de íons de 260 $^{\circ}\text{C}$.

5.4 Caracterização Térmica

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi usada para determinar a temperatura de transição vítrea das ligninas e os eventos térmicos dos produtos obtidos. A análise foi realizada em um equipamento DSC Q20 da TA Instruments utilizando metodologia descrita por Li e McDonald (2014) com modificações. Para tal, amostras da matéria-prima e dos produtos, aproximadamente 3 mg, foram submetidas aos seguintes ciclos: 1) aquecimento de 25 a 90 $^{\circ}\text{C}$, 2) isoterma em 90 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos 3) resfriamento de 90 a 0 $^{\circ}\text{C}$ 4) isoterma a 0 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos 5) aquecimento de 0 a 230 $^{\circ}\text{C}$. Todos os ciclos foram realizados a uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, em cadinho de alumínio hermético e atmosfera de N_2 a um fluxo de 50 mL/min.

A análise termogravimétrica (TGA) foi efetuada para determinar a resistência térmica do material. Na análise termogravimétrica, as amostras, de aproximadamente 8 mg, foram aquecidas de 30 até 900 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e fluxo de nitrogênio de 40 mL /min em um analisador térmico PerkinElmer STA 6000 usando panela de platina.

5.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

O FTIR foi usado para caracterizar os grupos funcionais existentes nos diferentes tipos de ligninas. Os espectros vibracionais na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu modelo IRTracer-100, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr), na porcentagem

de 5% de amostra em relação a massa total da mistura, obtidas por prensagem por 5 minutos a oito toneladas.

5.6 Espectroscopia de absorção na região de UV-VIS

Aproximadamente 5 mg de amostra foi dissolvida em 5 mL de 1,4 dioxano com a adição de 5 mL de NaOH 0,2 mol/L, que também foi usada como o branco. O espectro UV-Vis foi obtido em um espectrofotômetro ultravioleta-visível Shimadzu modelo UV-2450 na faixa de 190 a 900 nm, de acordo com procedimento descrito por Jablonsky *et al.* (2015) com modificações.

5.7 Atividade antioxidante da lignina

5.7.1 Atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante foi determinada conforme metodologia descrita por Dizhbite *et al.* (2004). As amostras foram misturadas à 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH •) que, na sua forma radical, apresenta uma absorção característica em 517 nm. À medida que o DPPH é reduzido por um antioxidante (AH) ou por espécies radicalares (R•) essa absorção é reduzida gradualmente.

As amostras de lignina foram dissolvidas em 1,4 dioxano (C₄H₈O₂) na concentração de 3 mg/mL. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi dissolvida em 3,9 mL de uma solução de (DPPH•) 6,5x10⁻⁵ mol/L. A absorbância foi medida em 517 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-vis modelo UV-2450 em intervalos de tempo definidos. O branco foi considerado apenas como a solução de (DPPH •).

Os valores da IC₅₀ para as amostras foram calculados segundo Rufino *et al.* (2007). Nesse procedimento foi construído um gráfico da absorbância por uma faixa de concentração das amostras, onde foi realizada uma regressão linear dos pontos e determinada a respectiva equação da reta. Em seguida foi calculada a concentração responsável por reduzir a absorbância em 50 % (IC₅₀), das duas amostras com maior atividade antioxidante P-10, P-20, a matéria-prima de partida L e LAA e do antioxidante comercial BHT. Foram preparadas as seguintes concentrações: 1 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL das quatro amostras mencionadas acima. Os valores da IC₅₀ permitem uma comparação mais precisa e exata do potencial antioxidante, uma vez que relacionam uma faixa de diferentes concentrações das amostras com o tempo suficiente para que a reação com o (DPPH•) seja estabilizada.

5.7.2 Atividade antioxidante pelo método TEAC/ABTS

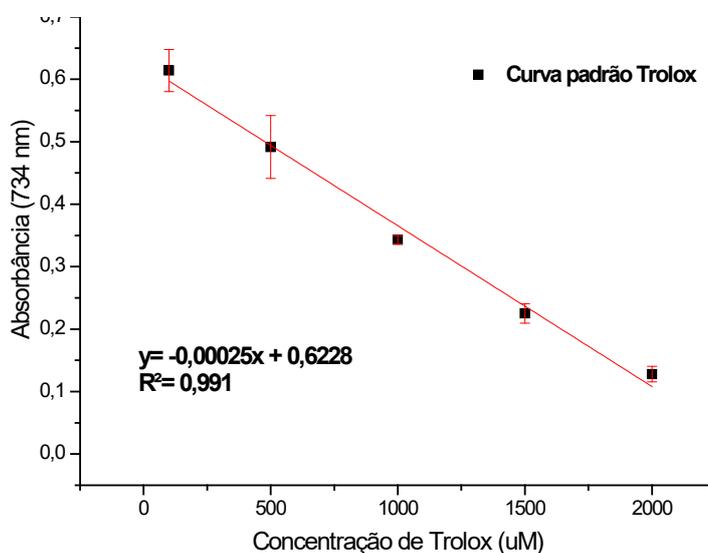
O ensaio TEAC/ ABTS foi realizado conforme procedimento descrito por Nenadis et al. (2004) com modificações. O cátion radical ABTS \cdot^+ foi gerado pela reação de 5 mL da solução estoque de ABTS (7 mmol/L) com 88 μ L da solução de persulfato de potássio 140 mmol/L ($K_2S_2O_8$). A mistura foi mantida em repouso por 15 h no escuro à temperatura ambiente e foi diluída com etanol absoluto para obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Essa diluição foi preparada e usada apenas no dia do ensaio.

Em um ambiente escuro, uma alíquota de 30 μ L de cada diluição das amostras foi transferida para tubos de ensaio com 3,0 mL de radical ABTS $^{+\cdot}$ e homogeneizada em um agitador de tubos. A diminuição da absorbância a 734 nm foi registrada após 6 minutos em um espectrofotômetro ultravioleta-visível Shimadzu modelo UV-2450. Cubetas retangulares de poliestireno, passo ótico 10 mm, capacidade 1,5 mL foram utilizadas nas medidas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Uma solução padrão de Trolox $\text{\textcircled{R}}$ (2000 mmol/L) foi diluída para as concentrações finais de 1500, 1000, 500 e 100 mmol/L. Em seguida, uma alíquota de 30 μ L de cada solução com diferentes concentrações foi misturada em um tubo de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS $^{+\cdot}$ e homogeneizada em um agitador de tubos. A diminuição da absorbância a 734 nm foi registrada após 6 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A curva padrão de Trolox $\text{\textcircled{R}}$ para o ABTS foi obtida a partir do gráfico das concentrações de Trolox $\text{\textcircled{R}}$ (μ M ou mmol/L) pelas respectivas absorbâncias. (Figura 16)

Figura 16- Curva padrão de Trolox para ABTS.



Fonte: elaborada pelo autor

5.7.3 Atividade antioxidante pelo método FRAP

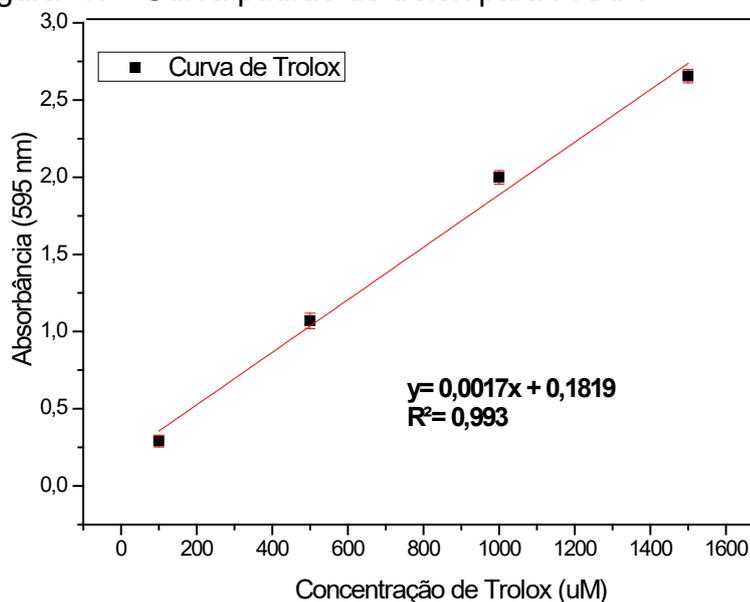
O ensaio FRAP foi executado de acordo com o procedimento relatado por Benzie e Strain (1996) com algumas modificações. O reagente FRAP foi obtido misturando 25 mL de tampão acetato 300 mmol/L, 2,5 mL de solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM e 2,5 mL de 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ) 10 mmol/L e foi usado imediatamente após sua preparação.

Em um ambiente escuro, uma alíquota de 150 µL de cada diluição da amostra foi transferida para tubos de ensaio com 2850 µL de solução FRAP que foi homogeneizada em um agitador de tubos. A mistura foi mantida a 37 ° C no escuro. A absorbância do produto colorido a 595 nm foi registrada após 30 min em um espectrofotômetro ultravioleta-visível Shimadzu modelo UV-2450. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Uma solução padrão de Trolox ® (2000 mmol/L) foi diluída para as concentrações finais de 1500, 1000, 500 e 100 mmol/L. As medidas de absorbância seguiram os procedimentos já descritos no parágrafo anterior.

A curva padrão de Trolox ® para o FRAP foi obtida a partir do gráfico das concentrações de Trolox ® (µM ou mmol/L) pelas respectivas absorbâncias (Figura 17).

Figura 17 - Curva padrão de trolox para FRAP.



Fonte: elaborada pelo autor

5.8 Caracterização das Nanofibrilas de celulose

5.8.1 Determinação do Teor de carboxilato e grau de oxidação

A celulose bacteriana nanofibrilada oxidada (CBNOX) apresentou teor de carboxilato 1,186 mmol/g celulose e grau de oxidação 19,5 %. Para Saito et al (2007), nanofibrilas com teor de carboxilato a partir de 1,0 mmol/g celulose permitem dispersão homogênea em água.

5.8.2 Determinação do potencial Zeta

O potencial Zeta da celulose bacteriana nanofibrilada oxidada (CBNOX) foi de $-63 \pm 0,46$ mV. Esse valor indica uma grande capacidade de dispersão na água, conforme relatado por Tonoli *et al.* (2012). Benhamou *et al.* (2014), obtiveram valores muito próximos -59.1 ± 3.7 mV para celulose nanofibrilada oxidada por TEMPO.

5.9 Emulsões de Pickering

5.9.1 Formulações

As emulsões de Pickering devido sua elevada estabilidade e baixa citotoxicidade são carregadores de diversas moléculas ativas dentre as quais a lignina. Desse modo, na formulação das emulsões, 10 mg de cada amostra da lignina

e produtos alquilados foram dispersos em 5 mL de azeite de oliva extravirgem, sob agitação magnética durante 24 horas. Em seguida, foram pesadas 21,90 g de celulose nanofibrilada obtida do melaço com oxidação mediada pelo 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxilo (TEMPO). A esta massa foi adicionada água destilada até atingir o valor de 45 g, o que produziu uma emulsão 0,35%*m/m*. Posteriormente, a fase óleo com as amostras dispersas foi adicionada. Essa mistura foi homogeneizada em um Ultra-Turrax T-50 (IKA, Brasil) durante 10 min a uma rotação de 10000 rpm. Obteve-se assim a emulsão de Pickering.

5.9.2 Determinação do volume das gotas da emulsão

Aproximadamente, 10 μ L da emulsão obtida na etapa anterior foi colocada em lamínulas e observada em um microscópio Axio imager A2 da Carl Zeiss, as lamínulas foram fotografadas com uma câmera acoplada ao microscópio, com aumentos de 5, 10 e 20 vezes. Em seguida, as imagens foram tratadas no programa Image J e Origin 8.5 para determinação do volume das gotas.

5.9.3 Ângulo de contato do azeite, celulose bacteriana (CBNOX) e amostras

O ângulo de contato foi determinado pela observação ótica da deposição dos líquidos de interesse na superfície do vidro. A liberação foi regulada pelo gotejamento de uma seringa preenchida com os líquidos em estudo. Ao sistema foi acoplada uma câmera digital pixeLink Nikon e o programa de computador GBX da Instrumentation Scientific mediu os ângulos de contato.

5.10 Ensaio de citotoxicidade do Alamar Blue ®

Nos ensaios de citotoxicidade emulsões de Pickering foram formuladas (conforme descrito no tópico 5.7) apenas com celulose bacteriana nanofibrilada oxidada (CBNOX) e azeite de oliva extravirgem sendo essas amostras denominada de emulsão do Branco afim de mensurar os efeitos do meio. A mesma formulação foi usada com adição das respectivas amostras para determinar a citotoxicidade dos compostos de interesse.

A citotoxicidade das amostras foi avaliada pelo método direto, no qual a viabilidade celular é medida após a exposição das células às amostras em diferentes concentrações (10-120 μ g/mL). As amostras foram esterilizadas por autoclavagem

durante 15 min, seguido de diluição em meio de cultura celular (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1mM de piruvato e 1% de penicilina-estreptomicina).

As células HaCat (queratinócitos humanos) foram semeadas em meio DMEM suplementado a uma densidade de 1×10^4 células / poço na placa de poliestireno de 96 poços, seguido de incubação a 37°C (5% de CO₂ e 95% de umidade) por 24 h. Posteriormente, o meio de cultura foi removido dos poços e 100 µL das amostras foram adicionadas a cada poço e a placa foi novamente incubada a 37 °C por 24 ou 48 h.

Após esse período, o extrato foi removido dos poços e foram adicionados 120 µL de meio DMEM suplementado contendo o reagente AlamarBlue® (25 mg/L) e a placa foi incubada por 4 h em condições padrão de cultura. Em seguida, 100 µL do meio contendo o AlamarBlue® metabolizado foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e medidos em um leitor de microplacas (SpectraMax i3x, Molecular Device, Sunnyvale, EUA) no modo de fluorescência (λ excitação = 560 nm e λ emission = 590 nm).

Os grupos controle positivo e negativo foram realizados expondo as células apenas ao meio de cultura DMEM suplementado e ao DMSO a 40%, respectivamente. A viabilidade das células do grupo de controle positivo foi assumida como 100% da viabilidade celular.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização da matéria-prima

A Tabela 5 apresenta a composição química das fibras do mesocarpo do dendê. Lignina e hemiceluloses são os constituintes majoritários. O teor de lignina encontrado foi semelhante ao relatado na literatura, 30,3 % para lignina obtida da mesma fonte (SOUZA *et al.*, 2016). Desse modo a matéria-prima é uma fonte promissora para extração de lignina. O teor de hemiceluloses e extrativos podem variar em função da origem do lote das fibras.

Tabela 5 – Composição química das fibras do mesocarpo do dendê.

Constituintes	Fibra do mesocarpo do dendê (%)	SOUZA <i>et al.</i> , 2016
Lignina	29,0 ± 3,0	30,3 ± 1,2
Hemiceluloses	28,0 ± 1,0	21,7 ± 0,1
Alfacelulose	23 ± 0,8	21,4 ± 5,1
Cinzas	3,7 ± 0,1	3,5 ± 0,1
Umidade	7,0 ± 0,4	7,8 ± 0,1
Extrativos	15,0 ± 0,3	9,9 ± 0,2

Fonte: elaborada pelo autor

6.2 Rendimentos da lignina

O processo acetossolve teve um rendimento de lignina de 61 % em relação a massa seca. A etapa adicional de auto hidrólise aumentou o rendimento para 73% em relação a massa de lignina da fibra bruta (Tabela 6). Segundo El Hage *et al.* (2010) essa etapa favorece o processo de hidrólise, dissolução de grande parte das hemiceluloses e quebra das ligações lignina-carboidrato, o que aumenta a eficiência da deslignificação. O que explica o aumento do rendimento da lignina LA. O rendimento do reator indica que 40% da matéria-prima inicial foi removida durante auto hidrólise.

Tabela 6 – Rendimento dos processos de extração da lignina

Amostras	Rendimento fibra (%)	Rendimento lignina (%)	Rendimento reator (%)
L	39	61 ± 0,5	–
LA	27	73 ± 2	60 ± 3

Fonte: elaborada pelo autor

6.3 Determinação de hidroxilas totais, fenólicas e carboxilas da lignina

Conforme a Tabela 7, o teor de hidroxilas fenólicas aumentou de 4,85 para 8,66 mmol /g em relação a lignina auto hidrolisada LA. LI *et al.* (2012) atribuíram o aumento de OH à quebra de ligações entre as unidades da lignina, principalmente ligações β -O-4, durante o processo de extração, o que resulta no aumento do teor de hidroxilas fenólicas e totais (Figura 3). A redução do teor de hidroxilas alifáticas e o concomitante aumento do teor de carboxilas, segundo Gong *et al.* (2016) pode estar relacionado à oxidação das hidroxilas alifáticas gerando grupos carboxilas.

Tabela 7 – Teor de hidroxilas totais, fenólicas e carboxilas.

Amostras	Teor (mmol /g)			
	OH total	OH fenólicas	OH alifáticas	carboxilas
L	11,8 ± 2,6	4,85 ± 0,11	6,95	0,55 ± 0,12
LA	15 ± 0,5	8,66 ± 0,25	6,34	1,16 ± 0,75

Fonte: elaborada pelo autor

6.4 Teor de extrativos da matéria-prima e produtos

Conforme Paes *et al.* (2013), celulose, lignina e hemicelulose e diversos compostos denominados de extrativos fazem parte da composição da madeira. Os extrativos incluem elevado número de compostos, como resinas, açúcares, taninos, ácidos graxos (gordura), dentre outros, que podem ser extraídos em água ou solventes orgânicos.

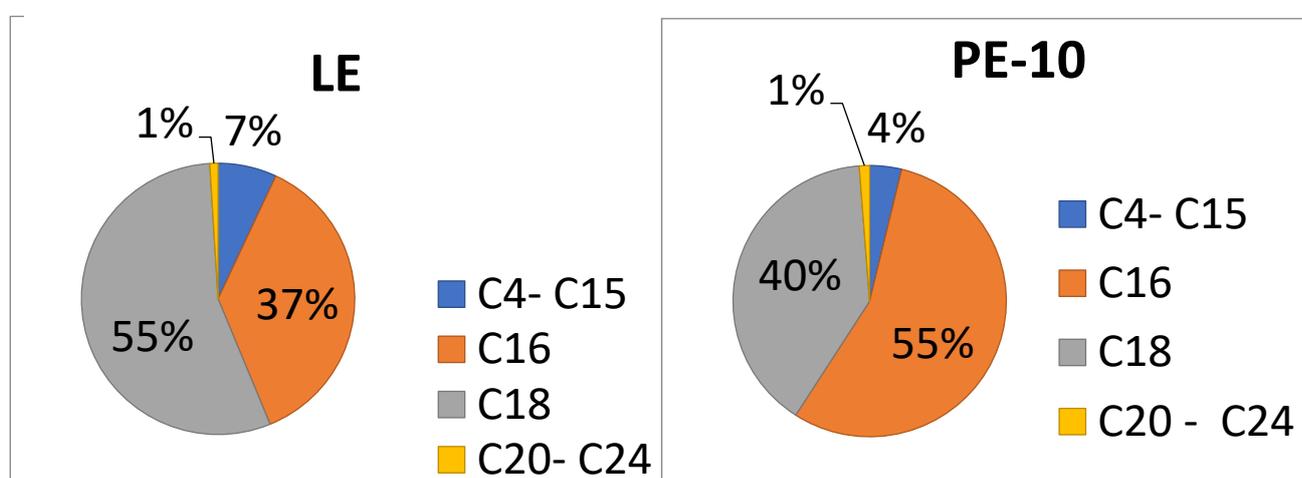
Como a torta do dendê é um subproduto da extração do azeite de dendê e o óleo de palmiste. Um grande percentual gordura ainda persiste mesmo após diversas etapas de processamento. As ligninas LE e LAE apresentam um teor de extrativos de 30%, enquanto que para os produtos o teor aumenta para 50% (Tabela 8). O perfil de ácido graxos da fração de gordura obtida após desengorduramento apresentou como ácidos graxos predominantes o ácido palmítico (C16) e oleico (C18). Um perfil semelhante foi obtido por Mancini *et al.* (2015) (Figuras 18,19). As variações nas porcentagens de ácidos graxos podem estar relacionadas com as frações de material prima que reagiram preferencialmente. A influência da auto hidrólise pode ter quebrado algumas cadeias de ácidos graxos em frações menores conforme observa-se na redução do teor de C18 na lignina acetossolve (LE) e o aumento de C16 (LAE) na lignina auto hidrolisada.

Tabela 8 – Teor de extrativos das amostras

Amostras	Teor de extrativos (%)
LE	34 ± 0,8
PE-10	49 ± 1,2
LAE	31 ± 1,6
PAE-20	51 ± 2,3

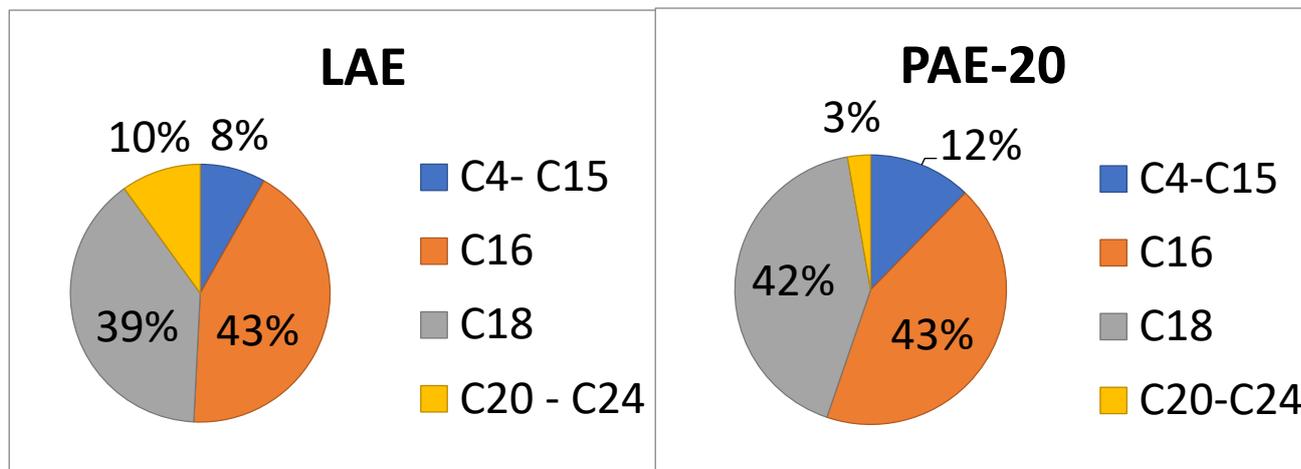
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 18 - Porcentagem de ácidos graxos da lignina LE e Produto PE-10



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 19 - Porcentagem de ácidos graxos da lignina LAE e produto PAE-20

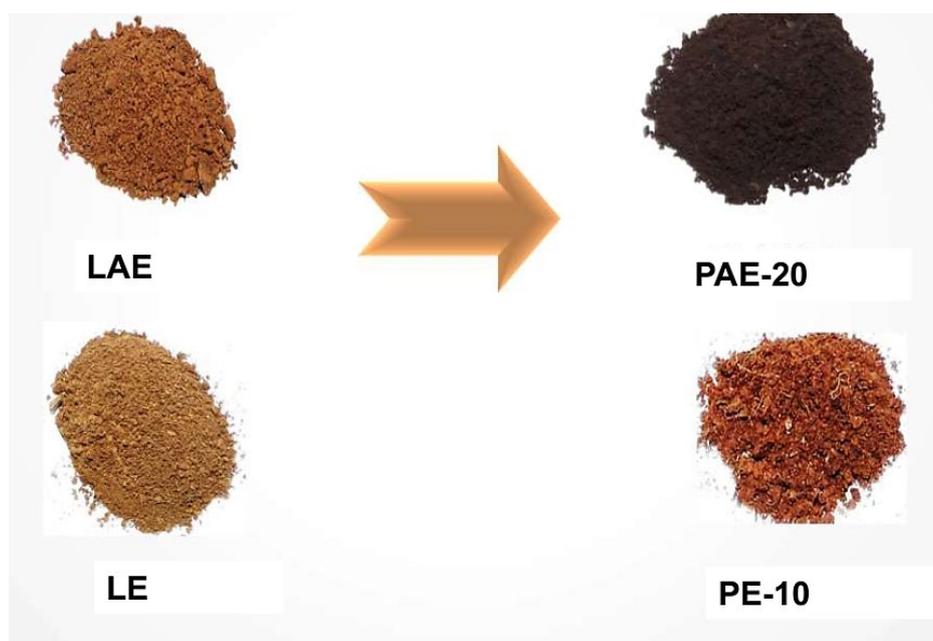


Fonte: elaborada pelo autor

6.5 Rendimentos dos produtos alquilados (PE-10, PAE-20)

Os produtos alquilados foram obtidos conforme observado na Figura 20. O rendimento dos produtos alquilados, em relação à massa inicial da matéria-prima, não varia significativamente. De um modo geral, o rendimento dos produtos não variou significativamente (Tabela 10). Essa porcentagem corresponde à fração solúvel em acetato de etila durante o processo de obtenção da lignina, as demais frações insolúveis em acetato de etila e solúveis em água foram descartadas por apresentarem características desfavoráveis a modificação.

Figura 20 - Matéria-prima e produto de lignina alquilada obtido.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 10 – Resultados das médias e desvios padrão dos rendimentos dos produtos

Tratamentos	Rendimento (%)
PE-10	43,3 ± 7,1
PE-15	38,7±8,1
PE-20	40,5±10,8
PAE-10	46,0 ±2,2
PAE-15	56,3±2,9
PAE-20	48,3±1,1

Fonte: elaborada pelo autor

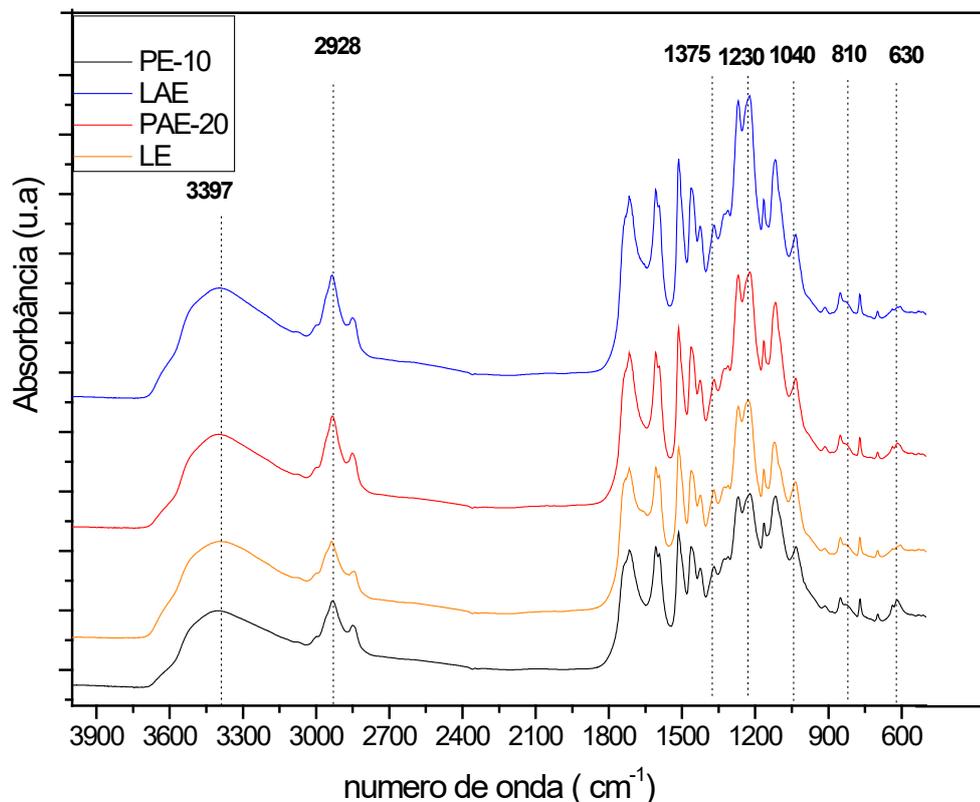
6.6 Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier

Os espectros apresentam na região entre 700 e 900 cm^{-1} apresenta as bandas relativas a vibrações de deformação das ligações C—H no anel benzênico. A banda em torno de 810 cm^{-1} que, segundo Trchová *et al.* (2004), é atribuída à deformação C-H de anéis aromáticos para-substituídos. A banda em 1040 cm^{-1} é atribuída a vibrações esqueléticas de anéis aromáticos orto-substituídos. Nos produtos PE-10 e PE-20 surge uma nova banda em torno de 630 cm^{-1} indica a presença de grupos aromáticos mono e poli substituídos (Figura 21).

A intensidade das bandas de absorção foi normalizada em relação à banda em 1515 cm^{-1} , relativa aos anéis aromáticos da lignina. Conforme Casas *et al.* (2012), essa banda específica apresenta quase sempre a mesma intensidade, logo pode ser usada como padrão para determinar a absorbância relativa das demais.

Conforme a Tabela 11, as razões das bandas 1230/1515, 1375/1515, 2928/1515 aumentam em relação à matéria-prima. Tais bandas evidenciam a reação de alquilação do anel aromático. No entanto, para o produto PE-10 esse aumento foi menor quando comparado ao produto PAE-20. Resultado semelhante foi obtido nos Espectros de ^1H RMN das amostras (Tabela 12).

Figura 21- FTIR das amostras LE, LAE, PE-10 e PAE-20.



Fonte: elaborada pelo autor

As bandas em 1162 e 1230 cm^{-1} são atribuídas à deformação C-H no plano do fenil 1,2 dissustituído. A banda em 1362 cm^{-1} corresponde à deformação axial de C-H do grupo terc-butila (Figura 3).

Tabela 11 – Absorbâncias relativas das ligninas.

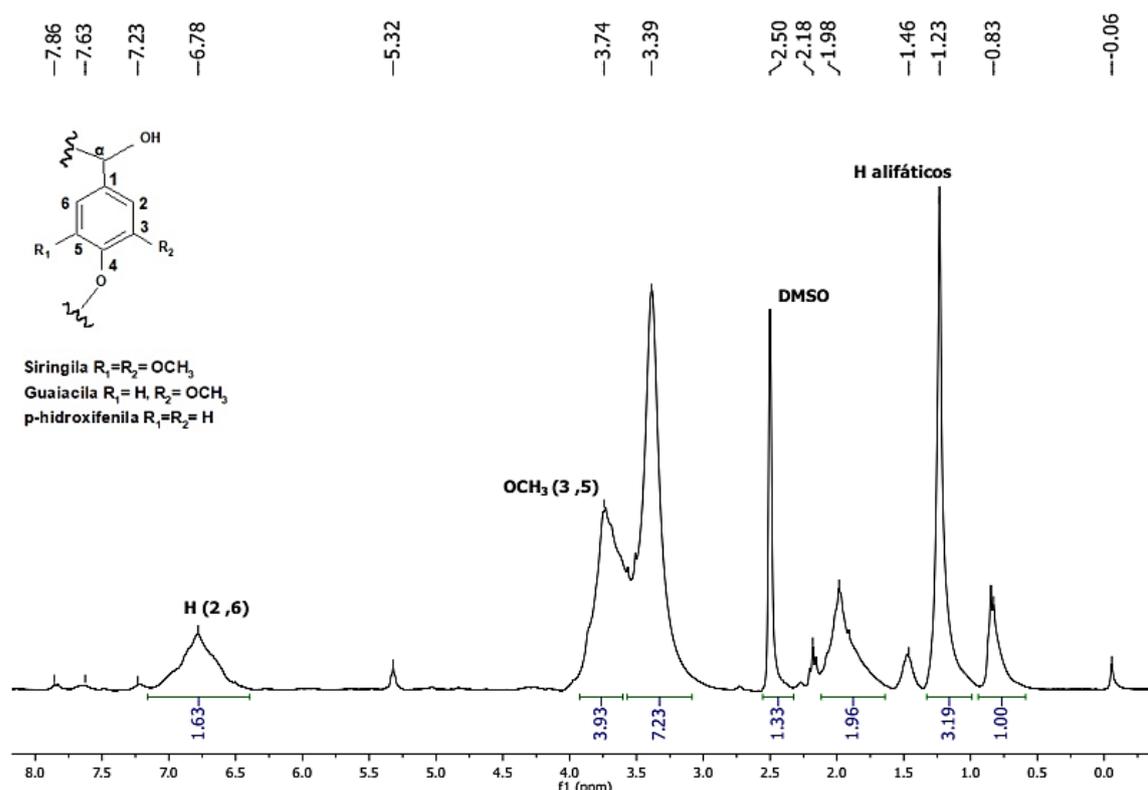
Amostra	Razão 1230/1515 Fenil 1,2- substituído	Razão 1375/1515 CH ₃	Razão 2928/1515 CH ₃	Razão 3397/1515 OH
LE	1,57	0,88	0,51	0,51
PE-10	1,54	0,89	0,60	0,49
LAE	1,64	0,87	0,57	0,50
PAE-20	1,70	0,91	0,65	0,50

Fonte: elaborada pelo autor

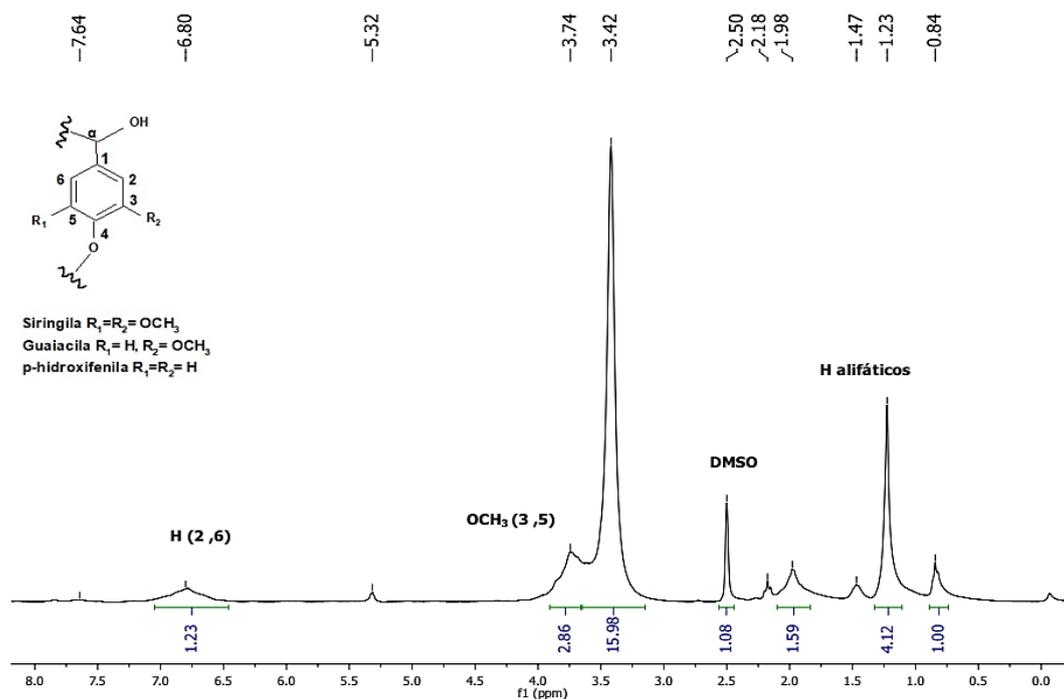
6.7 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

A integração dos sinais correspondentes aos hidrogênios alifáticos entre 0,8 e 1,5 ppm e hidrogênios aromáticos em unidades siringila (S), guaiacila (G) e p-hidroxifenila (H) nos espectros de ^1H RMN, entre 6,0 e 8,0 ppm, pode servir como indicativo do progresso da reação de alquilação. O sinal intenso que aparece em 3,74 ppm corresponde aos prótons metoxilas das unidades S e G. Esse sinal pode sofrer interferência pela presença de água residual do DMSO usado como solvente (3,39 ppm) (FERNÁNDEZ-COSTAS et al., 2014). Os valores das integrações foram normalizados em relação ao sinal 0,8 ppm que permanece constante (Figuras 22, 23, 24 e 25). Na Tabela 12, os valores das integrações normalizados para os sinais correspondentes aos grupos CH_3 e CH_2 , que ocorre entre a matéria-prima e o produto aumentou (DING et al., 2016). A análise desses valores para os hidrogênios aromáticos em unidades S, G e H releva que houve uma diminuição em relação a liqna alquilada, possivelmente, devido a substituição desses hidrogênios por grupos terc-butila. Essa tendência será posteriormente confirmada através dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC (Figuras 30,31, 32 e 33).

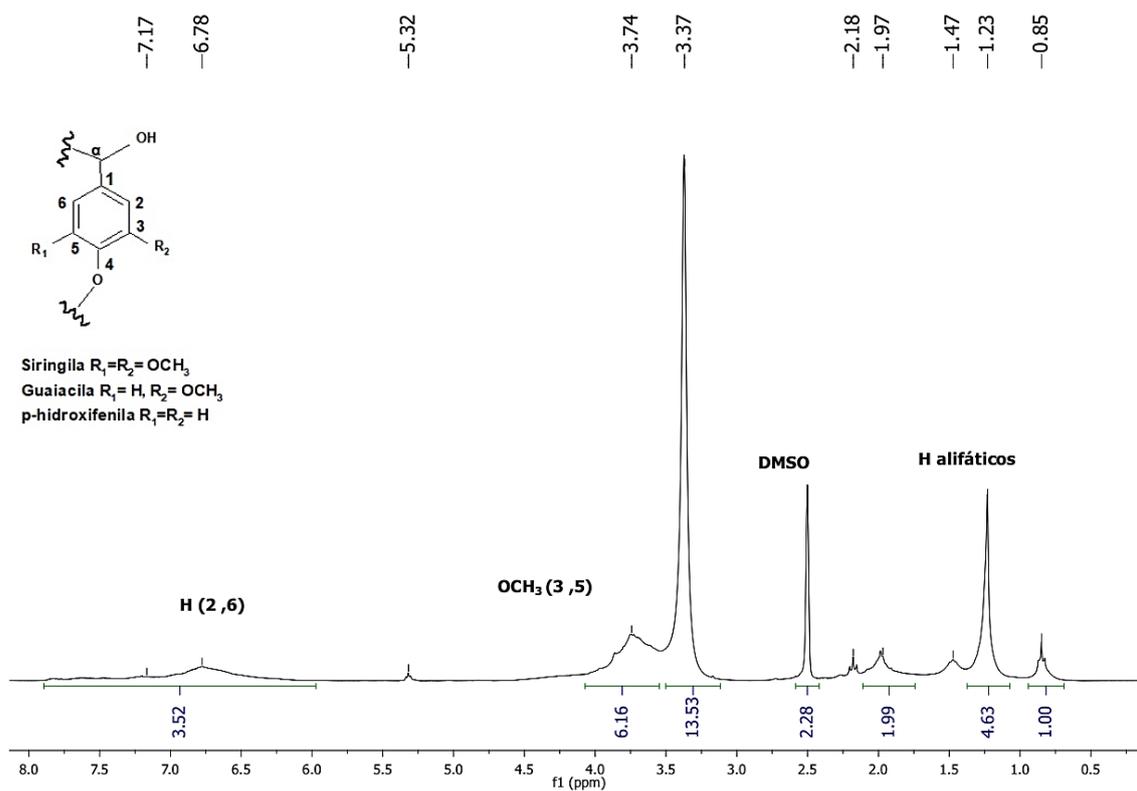
Figura 22 - Espectro de ^1H RMN da Lignina LE (300 MHz, 60mg/mL, DMSO, 27 °C)



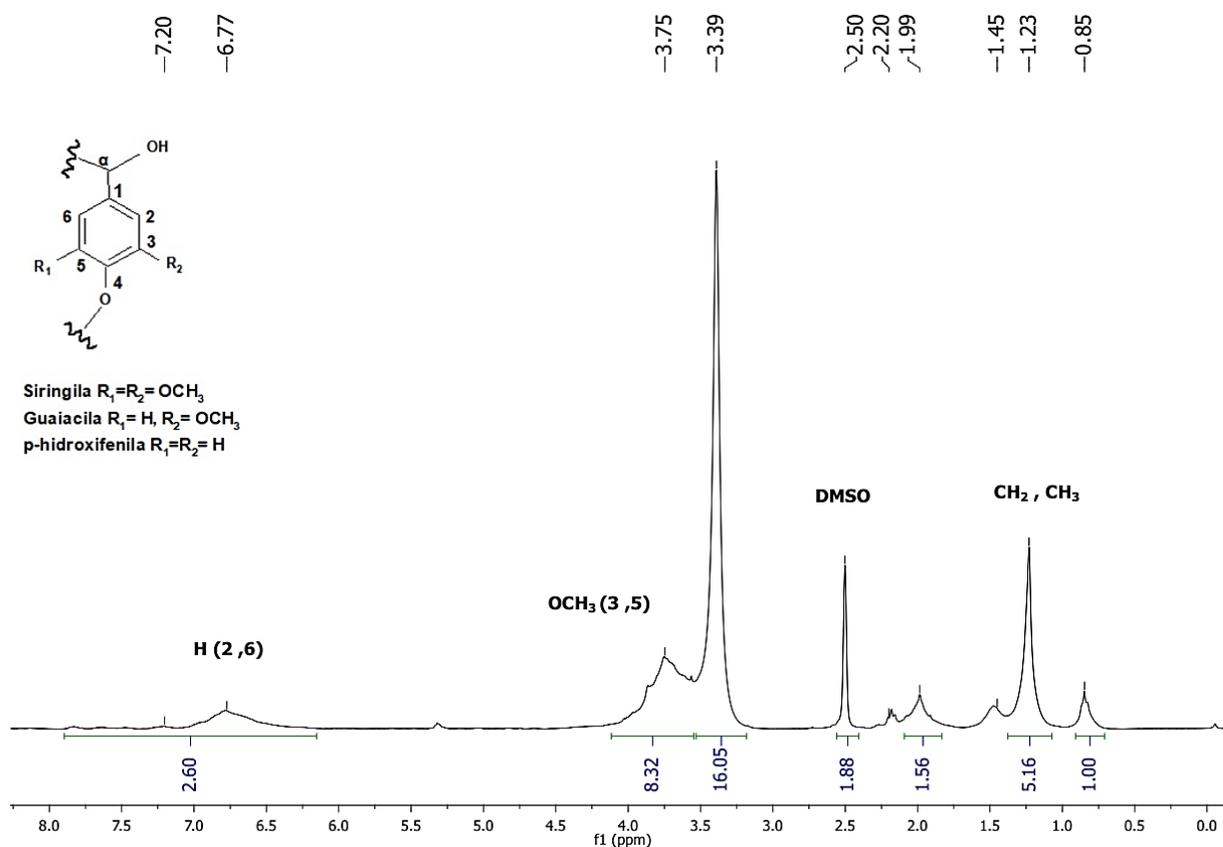
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 23 - Espectro de ^1H RMN da Lignina PE-10 (300 MHz, 60mg/mL, DMSO, 27 °C)

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 24 - Espectro de ^1H RMN da Lignina LAE (300 MHz, 60mg/mL, DMSO, 27 °C)

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 25- Espectro de ^1H RMN da Lignina PAE-20 (300 MHz, 60mg/mL, DMSO, 27 °C)

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 12- Valores das integrações normalizados dos sinais correspondentes aos prótons alifáticos e aromáticos.

Amostras	Hidrogênios alifáticos	Hidrogênios aromáticos
	(0,8 a 1,5 ppm)	(H 2,6- 6 a 8 ppm)
LE	3,19	1,63
PE-10	4,12	1,23
LAE	4,63	3,52
PAE- 20	5,16	2,60

Fonte: elaborada pelo autor

Os experimentos de HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) correlacionam o deslocamento químico do próton com o deslocamento químico do carbono diretamente ligado (ou nitrogênio). Esse experimento utiliza acoplamentos de uma ligação. A região da cadeia lateral (δ_C / δ_H 50-90 / 2,5-6,0 ppm) dos espectros do HSQC fornece informações estruturais importantes da lignina, como ligações Interatômicas (ver apêndices B, C, D e E).

Os espectros da lignina LE mostraram sinais correspondentes a $C\alpha-H\alpha$ nas subestruturas $\beta-O-4'$ (A) ligadas a uma unidade G em δ_C / δ_H 71,0 / 4,75 e ligadas à unidade S em δ_C / δ_H 71,7 / 4,87 (Figura 03). A correlação $C\alpha-H\alpha$ na subestrutura $\beta - \beta'$ resinol (B) foi observada em 84,9 / 4,67 e $C\gamma - H\gamma$ em 71,7 / 3,81 e 4,17 (Figura 26). Subestruturas de fenilcoumaranos (C) $C\alpha-H\alpha$ em $\beta-5'$ foram observadas em δ_C / δ_H 86,8 / 5,46 e $C\beta-H\beta$ em 53,7 / 3,44 (Tabela 13). Sinais para $C\alpha-H\alpha$ em subestruturas de dibenzodioxocina (D) a δ_C / δ_H 83,2 / 4,84 (Figura 34).

Nos espectros do produto PE-10, os sinais de ligações típicas de interunidades de lignina, como $\beta-O-4$, $\beta-\beta$, $\beta-5$, não puderam mais ser detectados. A ausência desses sinais indica que as frações menores reagiram preferencialmente para dar origem aos produtos (Figura 27).

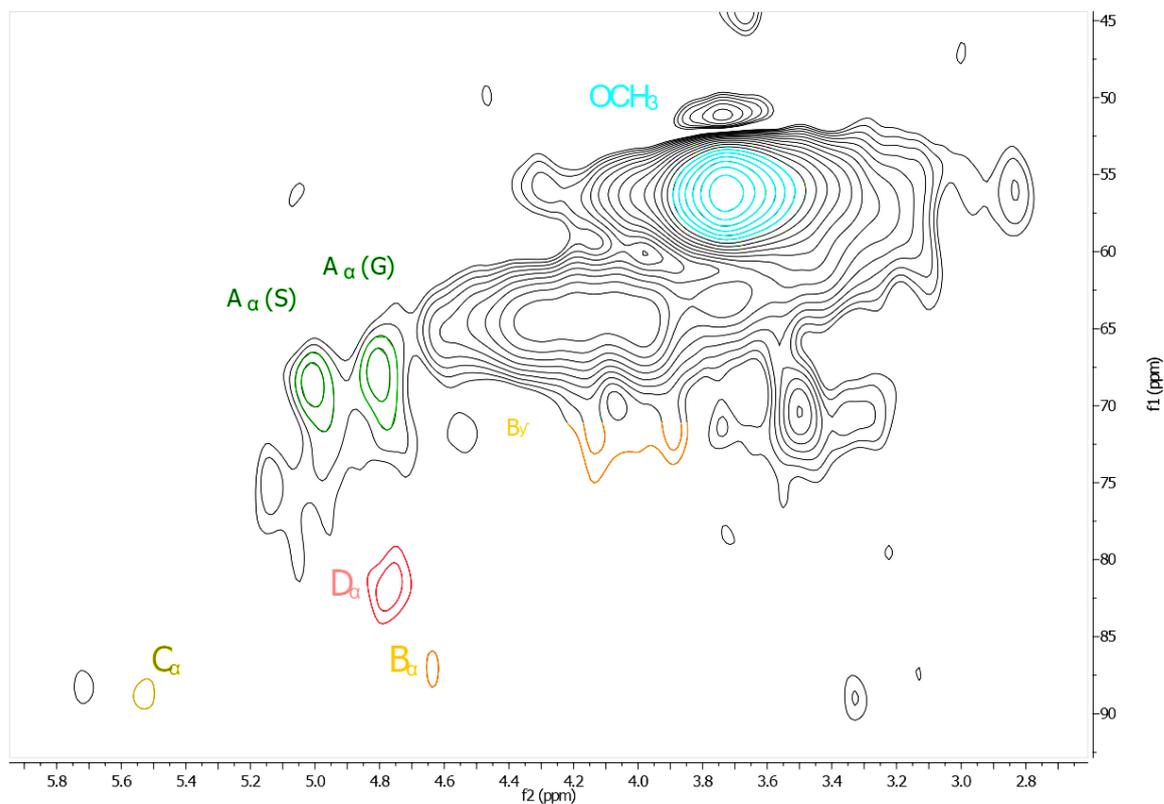
Na lignina do LAE, os sinais relacionados a essas ligações desaparecem, indicando que as ligações foram quebradas durante o processo de extração, deixando as ligações CB (Figura 28). Para o produto PAE- 20, essas ligações desaparecem mostrando a mesma tendência que o produto PE-10 (Figura 29).

Tabela 13 – Atribuição dos principais sinais de correlação ^{13}C e ^1H encontrados nos espectros HSQC.

Símbolo	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Atribuição
C_{β}	53,7/3,44	$\text{C}_{\beta}\text{-H}_{\beta}$ em $\beta\text{-5}'$ subestruturas (fenilcoumaranas) (C) ³
OCH_3	55, 7/ 3,73	C-H em metoxilas ¹
$\text{A}_{\alpha}(\text{G})$	71,0/ 4,75	$\text{C}_{\alpha}\text{-H}_{\alpha}$ em $\beta\text{-O-4}'$ subestruturas (A) ligadas a uma unidade G ³
$\text{A}_{\alpha}(\text{S})$	71,7/ 4,87	$\text{C}_{\alpha}\text{-H}_{\alpha}$ em $\beta\text{-O-4}'$ subestruturas (A) ligadas a uma unidade S ³
B_{γ}	71,7/3,81 and 4,17	$\text{C}_{\gamma}\text{-H}_{\gamma}$ em $\beta\text{-}\beta'$ subestruturas resinol (B) ³
D_{α}	83,2/ 4,84	$\text{C}_{\alpha}\text{-H}_{\alpha}$ em subestruturas de dibenzodioxocina (D) ³
B_{α}	84,9/ 4,67	$\text{C}_{\alpha}\text{-H}_{\alpha}$ em $\beta\text{-}\beta'$ subestruturas resinol (B) ³
C_{α}	86,8/ 5,46	$\text{C}_{\alpha}\text{-H}_{\alpha}$ em $\beta\text{-5}'$ subestruturas de fenilcoumaranos (C) ³
$\text{S}_{2,6}$	103,9/ 6,71	$\text{C}_2\text{-H}_2$ e $\text{C}_6\text{-H}_6$ em unidades S ¹
G_2	111 / 7,00	$\text{C}_2\text{-H}_2$ em unidades G ¹
$\text{pCA}_{3,5}$	115,4/ 6,84	$\text{C}_3\text{-H}_3$ e $\text{C}_5\text{-H}_5$ em p-coumarato (pCA) ²
$\text{H}_{3,5}$	114,9 / 6,76	$\text{C}_3\text{-H}_3$ e $\text{C}_5\text{-H}_5$ em unidades H ¹
G_5	116,1/ 6,78	$\text{C}_5\text{-H}_5$ em unidades G ¹
$\text{H}_{2,6}$	128,2/ 6,95	$\text{C}_2\text{-H}_2$ e $\text{C}_6\text{-H}_6$ em unidades H ¹
$\text{pCA}_{2,6}$	130/ 7,46	$\text{C}_2\text{-H}_2$ e $\text{C}_6\text{-H}_6$ em p-coumarato (pCA) ²

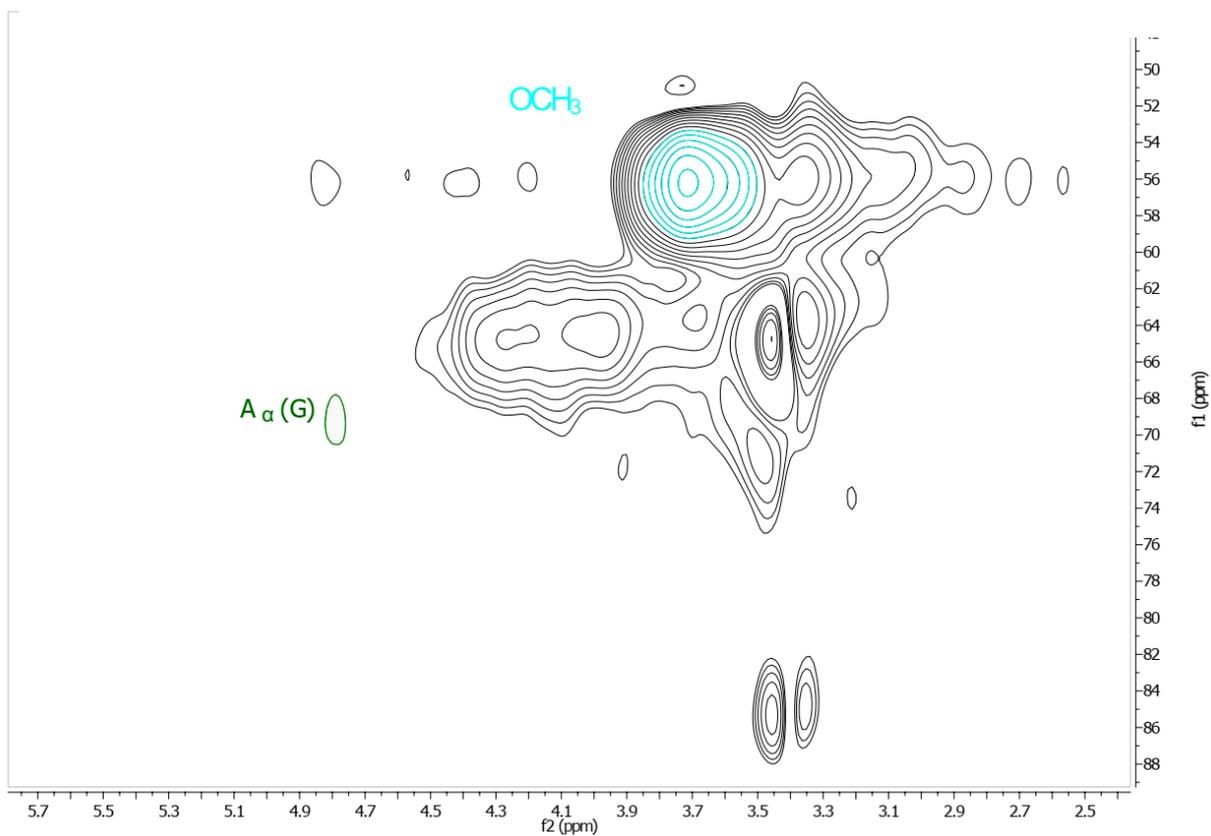
Fonte: ¹ Gong et al (2016), ² Hussin et al (2014), ³ Rencoret *et al.* (2013)

Figura 26- Regiões alifáticas dos espectros de RMN HSQC da lignina LE

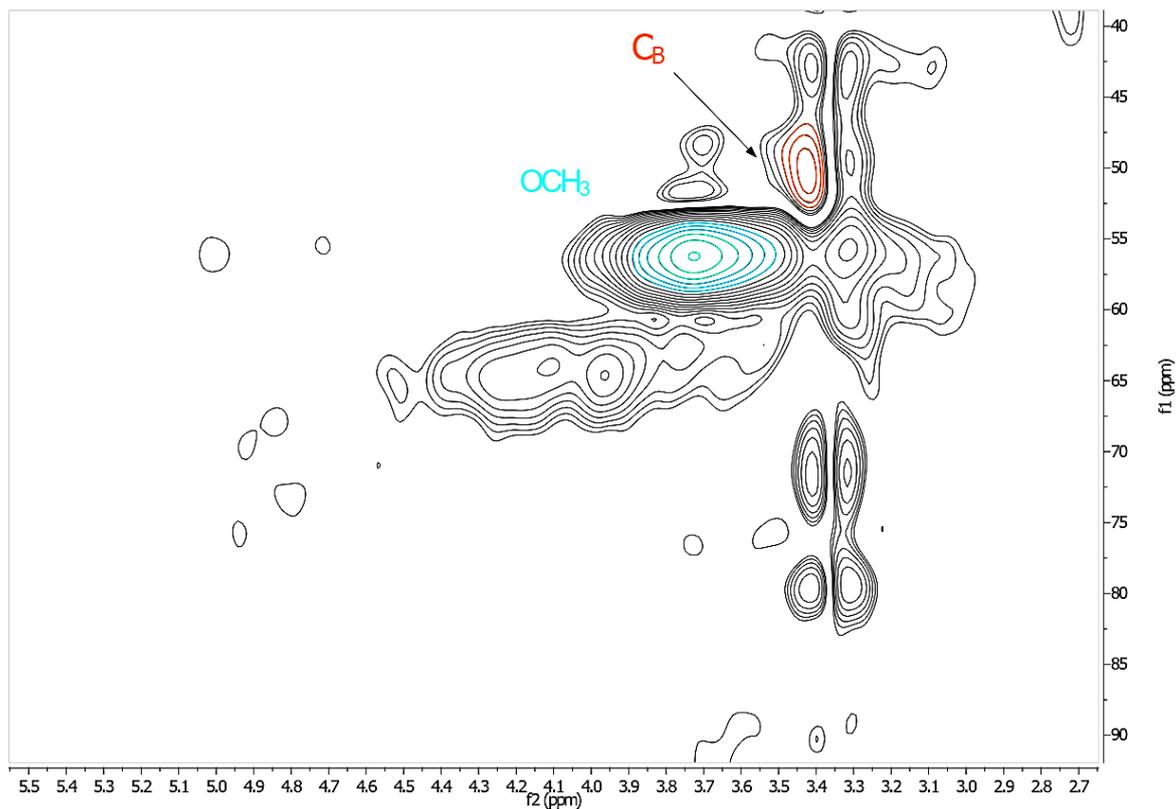


Fonte: elaborada pelo autor

Figura 27- Regiões alifáticas dos espectros de RMN HSQC da lignina PE-10

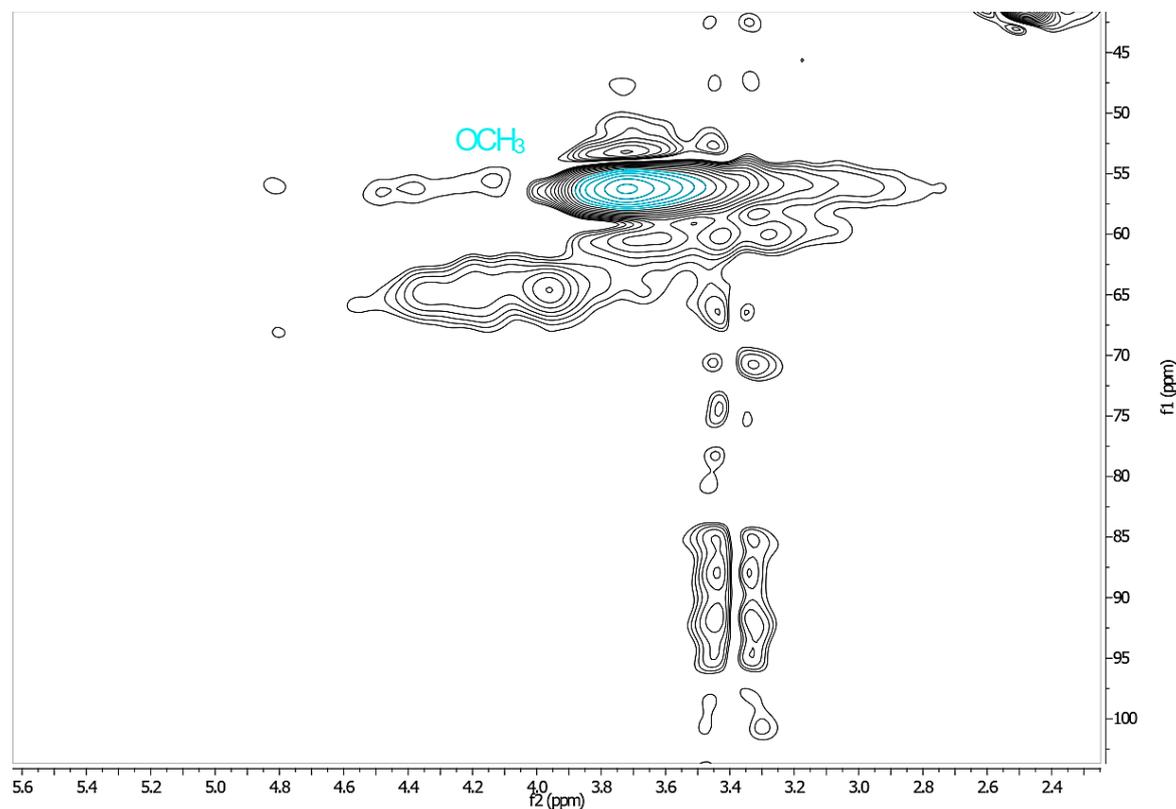


Fonte: elaborada pelo autor



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 29 - Regiões alifáticas dos espectros de RMN HSQC da lignina PAE- 20



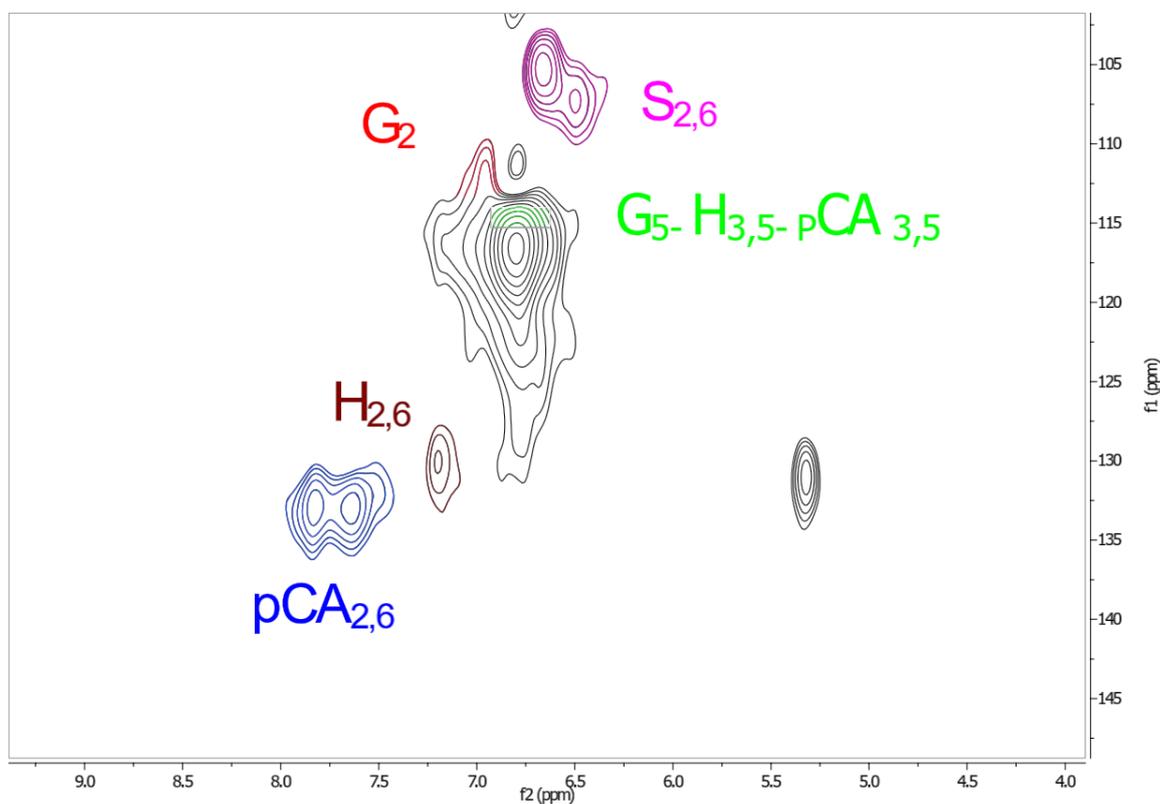
Fonte: elaborada pelo autor

Na região aromática (δ_C / δ_H 100–145 / 5.00–9.00 ppm) dos espectros 2D HSQC, as unidades G e S foram facilmente identificadas por suas correlações em 111 / 7,00, 116,1 / 6,78 e 103,9 / 6,71 ppm, correspondendo às posições G₂, G₅ e S_{2,6}, respectivamente (Figura 30). A presença de unidades H foi confirmada devido aos sinais de correlação em 114,9 / 6,76 (H_{3,5}) e 128,2 / 6,95 ppm (H_{2,6}). Correlações para p-coumarato (pCA) foram observadas em 115,4 / 6,84 ppm (p-CA_{3,5}) e 130,0 / 7,46 ppm (p-CA_{2,6}). As ligninas apresentaram as unidades estruturais siringil, guaiacil e p-hidroxifenil sendo classificadas como HGS.

De acordo com as Figuras 30 e 31, observa-se que a redução mais significativa nos sinais entre a matéria-prima LE e o produto PE-10 refere-se às unidades H no H₂ e H₆ o que pode ser indicativo de uma substituição do anel aromático nessas posições.

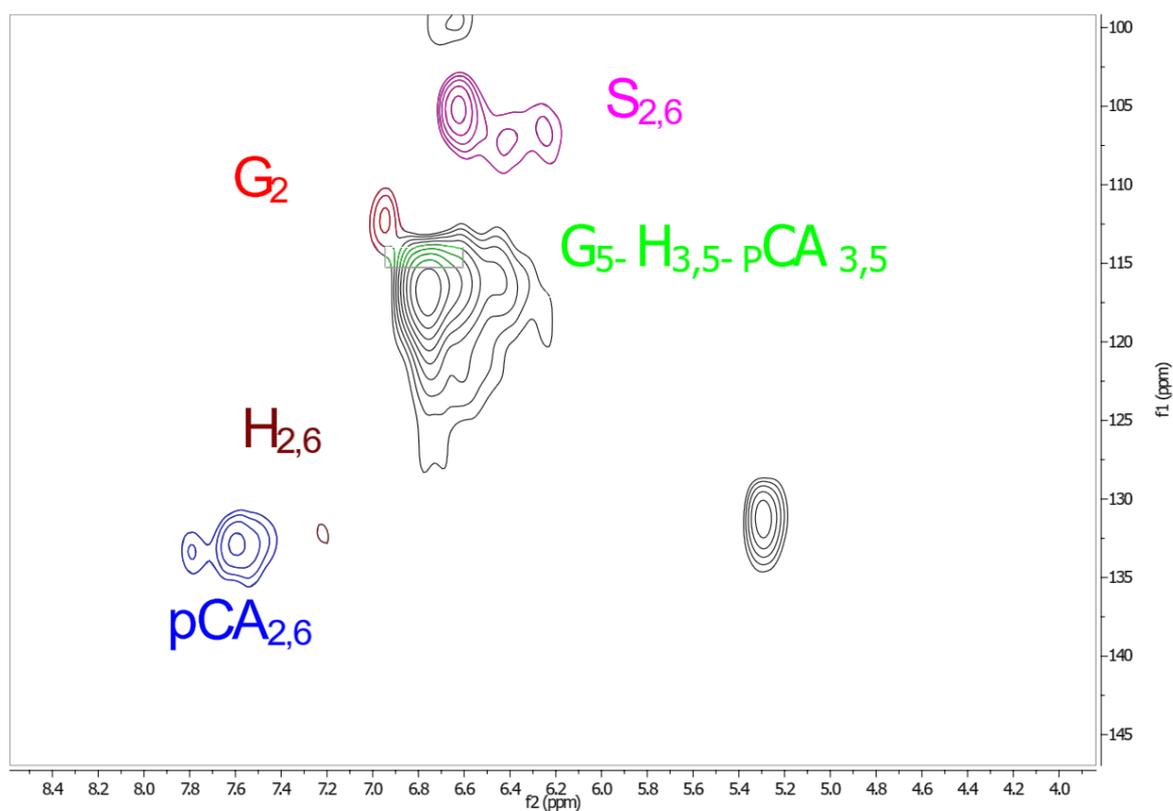
No produto PAE- 20, além de uma redução mais acentuada dos sinais H_{2,6} e pCA_{2,6} observa-se uma tendência semelhante para os sinais G₅-H_{3,5}-pCA_{3,5} em relação à matéria-prima LAE. Portanto, as unidades p-hidroxifenil (H), Guaiacil (G) e p-coumarato (pCA) podem ter reagido preferencialmente (Figuras 32 e 33).

Figura 30 - Regiões aromáticas dos espectros de RMN HSQC da Lignina LE.



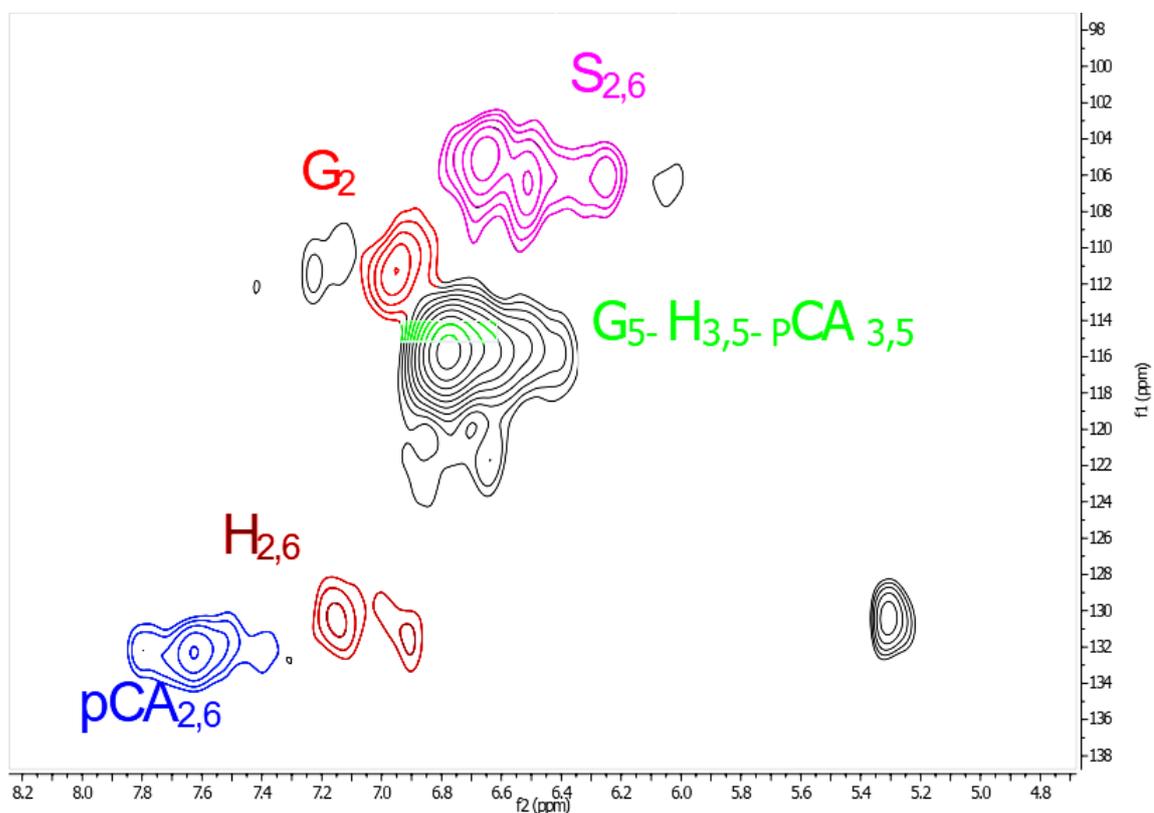
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 31- Regiões aromáticas dos espectros de RMN HSQC da Lignina PE-10.



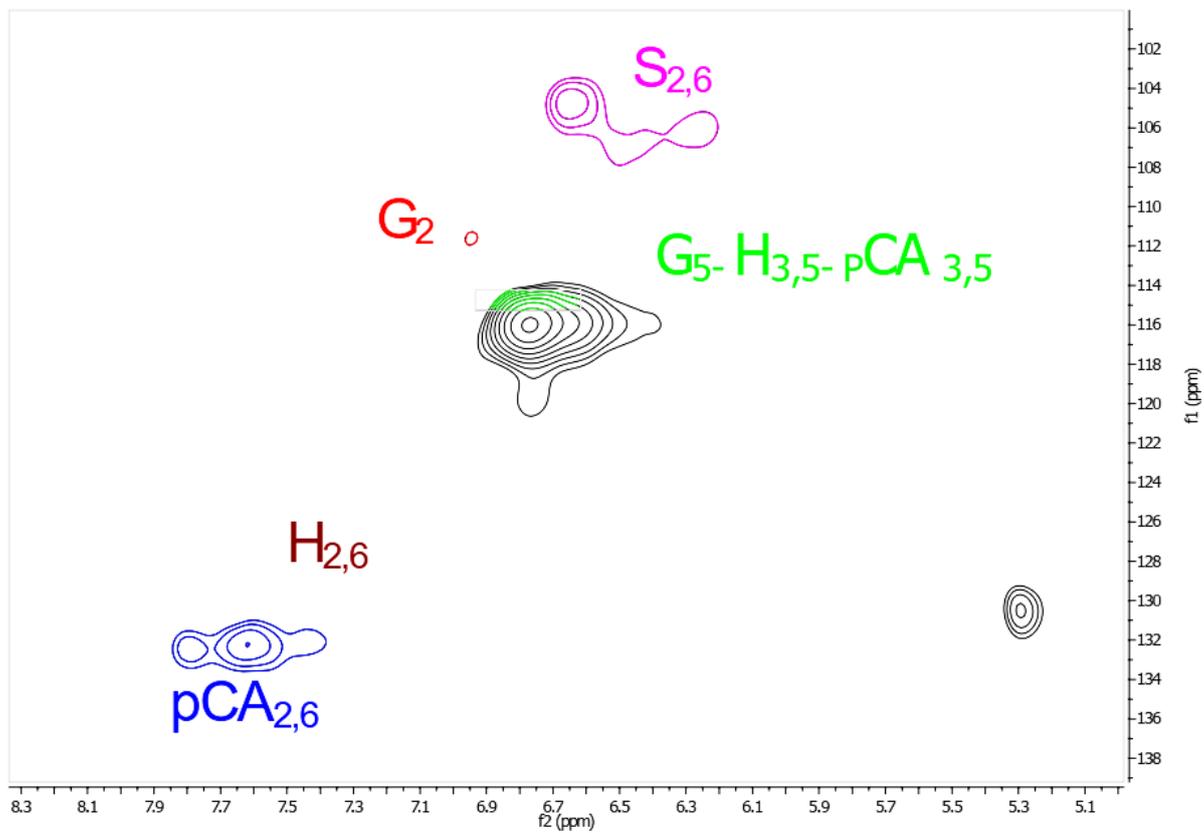
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 32- Regiões aromáticas dos espectros de RMN HSQC da Lignina LAE.



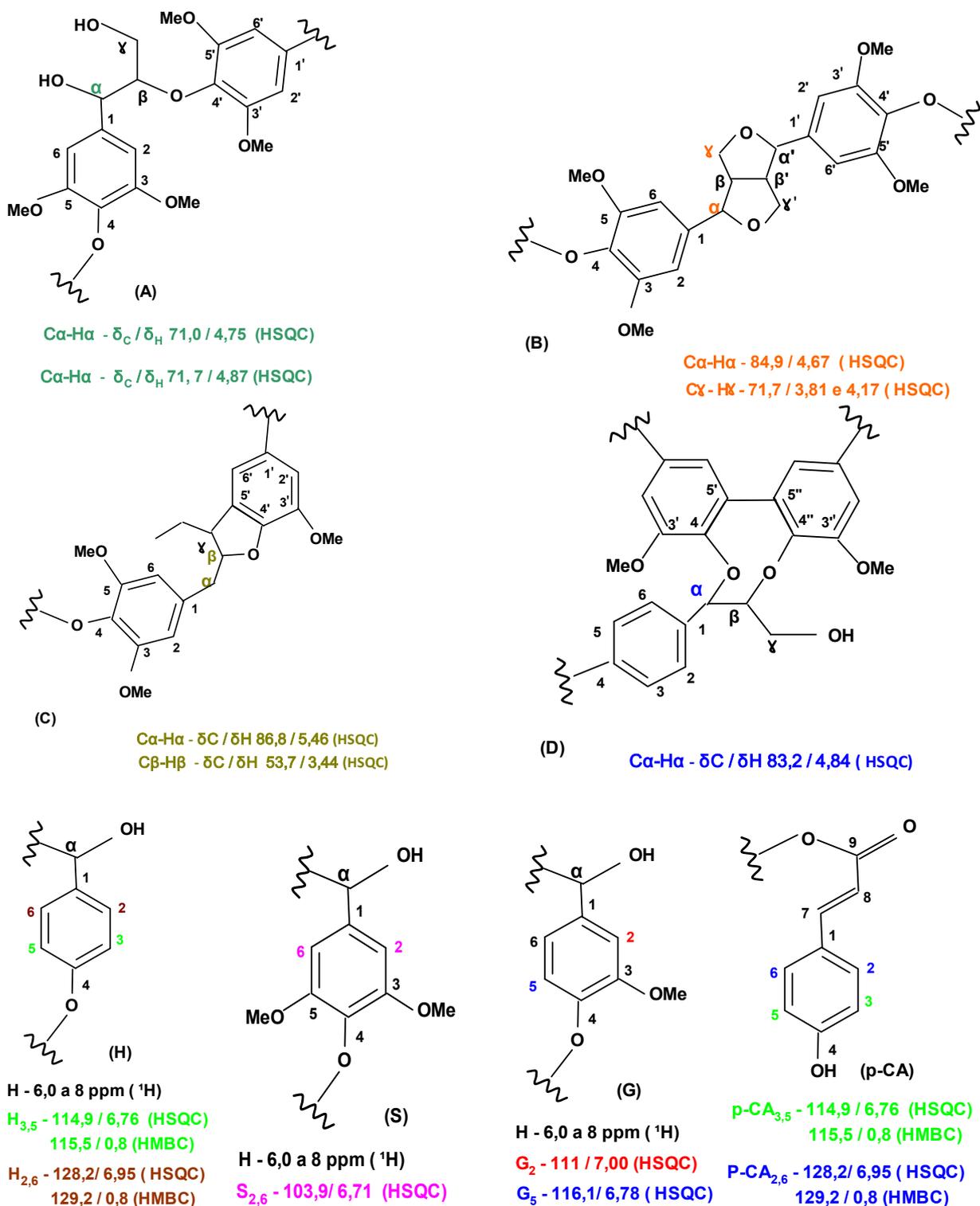
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 33- Regiões aromáticas dos espectros de RMN HSQC da Lignina PAE- 20



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 34 - Principais subestruturas de ligninas e produtos. subestruturas β -O-4' (A); subestruturas resinol (B); subestruturas de fenilcoumaranos (C); subestruturas de dibenzodioxocina (D); unidades guaiacila (G); unidades de siringila (S); unidades de p-hidroxifenila (H).

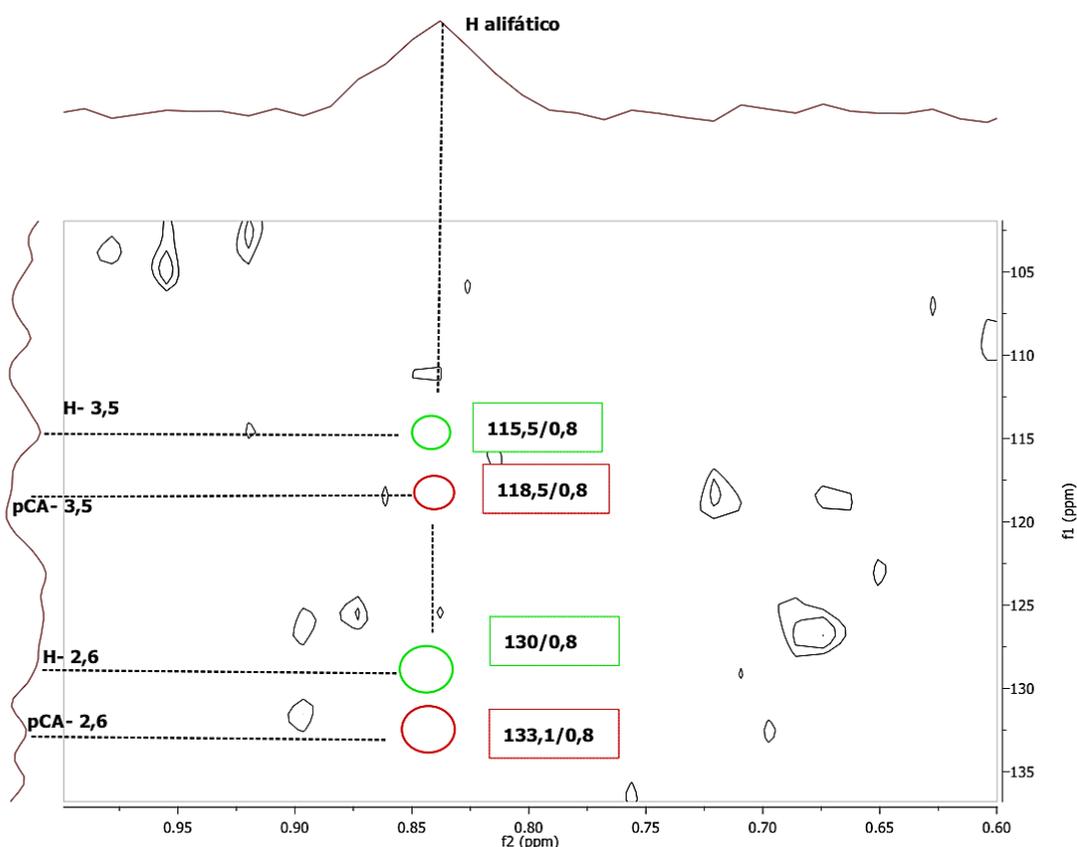


Fonte: elaborada pelo autor

O experimento HMBC (Correlação Heteronuclear de Ligações Múltiplas) fornece correlações entre carbonos e prótons que são separados por duas, três, às vezes em sistemas conjugados, quatro ligações. As correlações diretas de uma ligação são suprimidas. Nas regiões aromáticas dos espectros de RMN de HMBC das ligninas LE e LAE, não há correlação entre as unidades de p-hidroxifenil ($H_{2,6}$ e $H_{3,5}$) e o p-cumarato ($pCA_{2,6}$ e $pCA_{3,5}$) com o eixo de prótons na região alifática. (Figura 35 e 37)

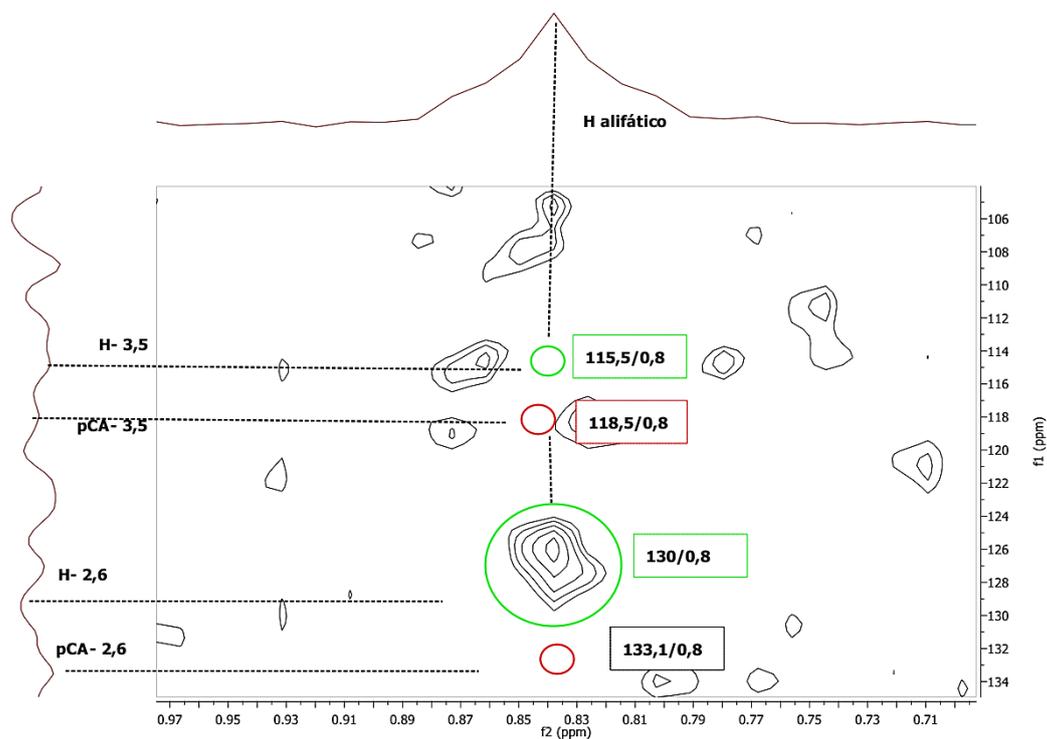
No entanto, para o produto PE-10, foi observada uma correlação de sinal dos carbonos nas unidades p-hidroxifenil ($H_{2,6}$) com o eixo de prótons na região alifática. Isto sugere que a reação de alquilação pode ter ocorrido nessas posições (Figura 36). O produto PAE- 20, além de mostrar as mesmas correlações que o produto PE-10, mostra novos sinais de unidades de p-hidroxifenil ($H_{3,5}$), p-cumarato ($pCA_{3,5}$) e p-cumarato ($pCA_{2,6}$) sugerindo que a reação de alquilação também ocorreu nessas posições (Figura 38). Uma possível explicação para esse resultado, pode ser o fato que a etapa de auto-hidrolise fragmentou a estrutura fornecendo novos sítios reacionais tais como p-hidroxifenil ($H_{3,5}$). Também aumentou a disponibilidade de grupos p-cumarato (pCA) nas posições 3,5 e 2,6.

Figura 35- Regiões aromáticas dos espectros RMN HMBC da lignina LE.



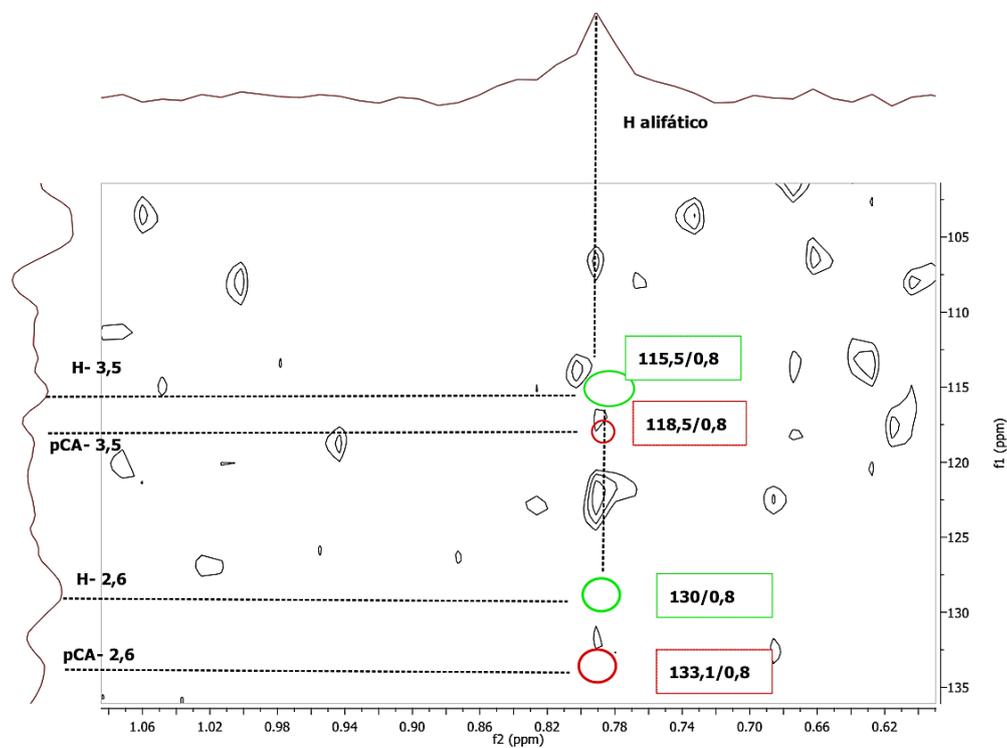
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 36 - Regiões aromáticas dos espectros RMN HMBC da lignina PE-10.



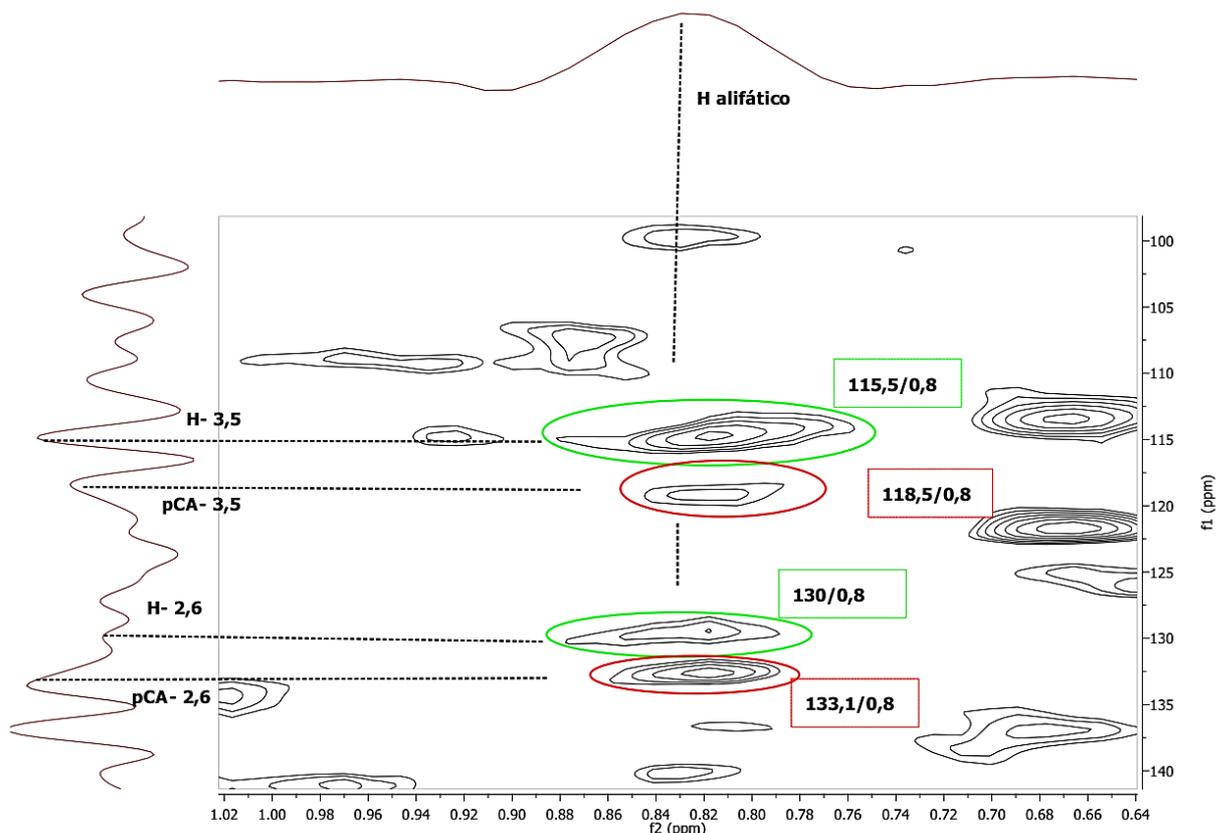
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 37- Regiões aromáticas dos espectros RMN HMBC da lignina LAE.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 38- Regiões aromáticas dos espectros RMN HMBC da lignina PAE-20.

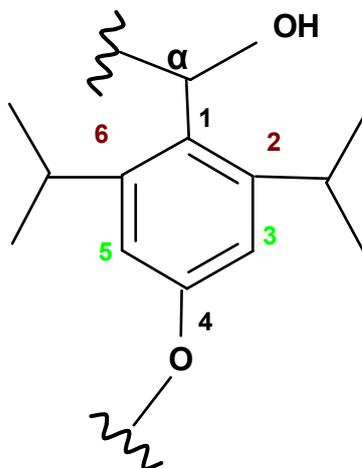


Fonte: elaborada pelo autor

Conforme observado na Figura 35, a unidade p-hidroxifenil (H) possui os hidrogênios nas posições 2,3,5 e 6 disponíveis para a reação de substituição eletrofílica. Como trata-se de um anel aromático substituído, a reação ocorrerá conforme os grupos dirigentes envolvidos. Nesse caso, tem-se um grupo alquila -CH e um grupo éter -O-R ambos orto-para-dirigentes. Logo as substituições ocorreram nos hidrogênios acima mencionados.

Analisando novamente os espectros RMN HMBC da lignina PE-10 (Figura 36). Observamos para esse produto correlações entre H alifáticos e unidade p-hidroxifenil (H) apenas nas posições 2,6. Desse modo, uma provável estrutura para esse produto está representada na Figura 39.

Figura 39 - Provável estrutura do produto formado a partir da lignina LE

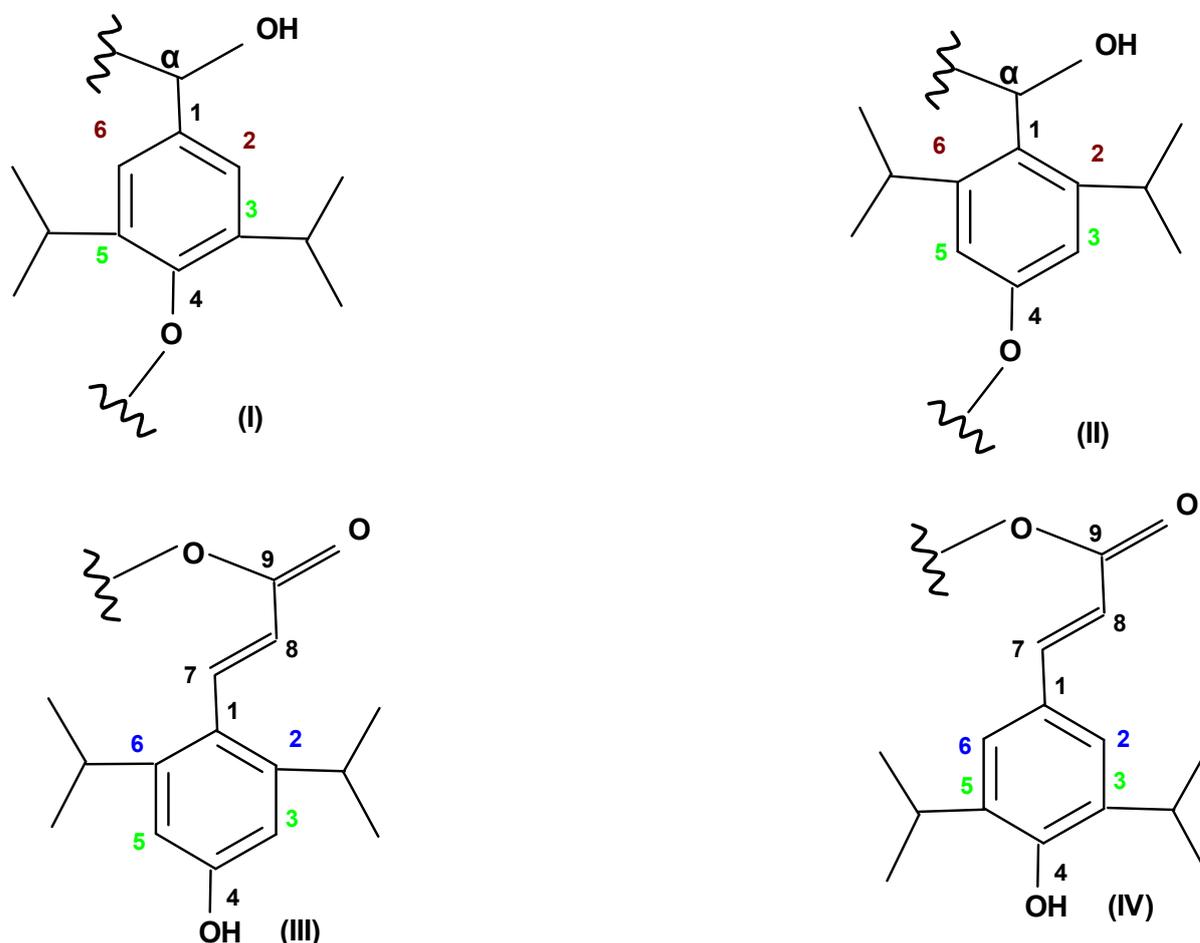


Fonte: elaborada pelo autor

Já para o produto PAE-20 (Figura 38), observa-se sinais de unidades de p-hidroxifenil ($H_{3,5}$) e ($H_{2,6}$), p-coumarato ($pCA_{3,5}$) e p-coumarato ($pCA_{2,6}$). Desse modo, para as unidades p-hidroxifenil a reação de substituição pode ter ocorrido nos hidrogênios nas posições 2,3,5 e 6 o que pode ter originado as supostas estruturas (I) e (II) apresentadas na Figura 40.

No que diz respeito às unidades p-coumarato (pCA), as quais possui um anel aromático com um substituinte meta-dirigente (posições 7 e 8) e outro orto-para-dirigente (carbono 4). Supõe-se que ambos os grupos orientem as substituições dos hidrogênios 3 e 5, enquanto o grupo orto-para-dirigente oriente a substituição nos hidrogênios 2 e 6. As possíveis estruturas originadas (III) e (IV) são apresentadas na Figura 40.

Figura 40– Prováveis estruturas formadas a partir das ligninas LE e LAE.



Fonte: elaborada pelo autor

6.8 Cromatografia de Permeação em Gel – GPC

A lignina LE apresentou $M_w = 3360$ g/mol, $M_n = 901$ g/mol e índice de polidispersividade $IP = M_w/M_n = 3,74$. Para lignina LAE os valores foram $M_w = 3700$ g/mol, $M_n = 917$ g/mol e índice de polidispersividade $IP = M_w/M_n = 4,03$. O produto alquilado PE-10 apresentou $M_w = 2390$ g/mol, $M_n = 896$ g/mol e índice de polidispersividade $IP = M_w/M_n = 2,67$. O produto PAE-20 os valores foram $M_w = 1550$ g/mol, $M_n = 707$ g/mol e índice de polidispersividade $IP = M_w/M_n = 2,2$.

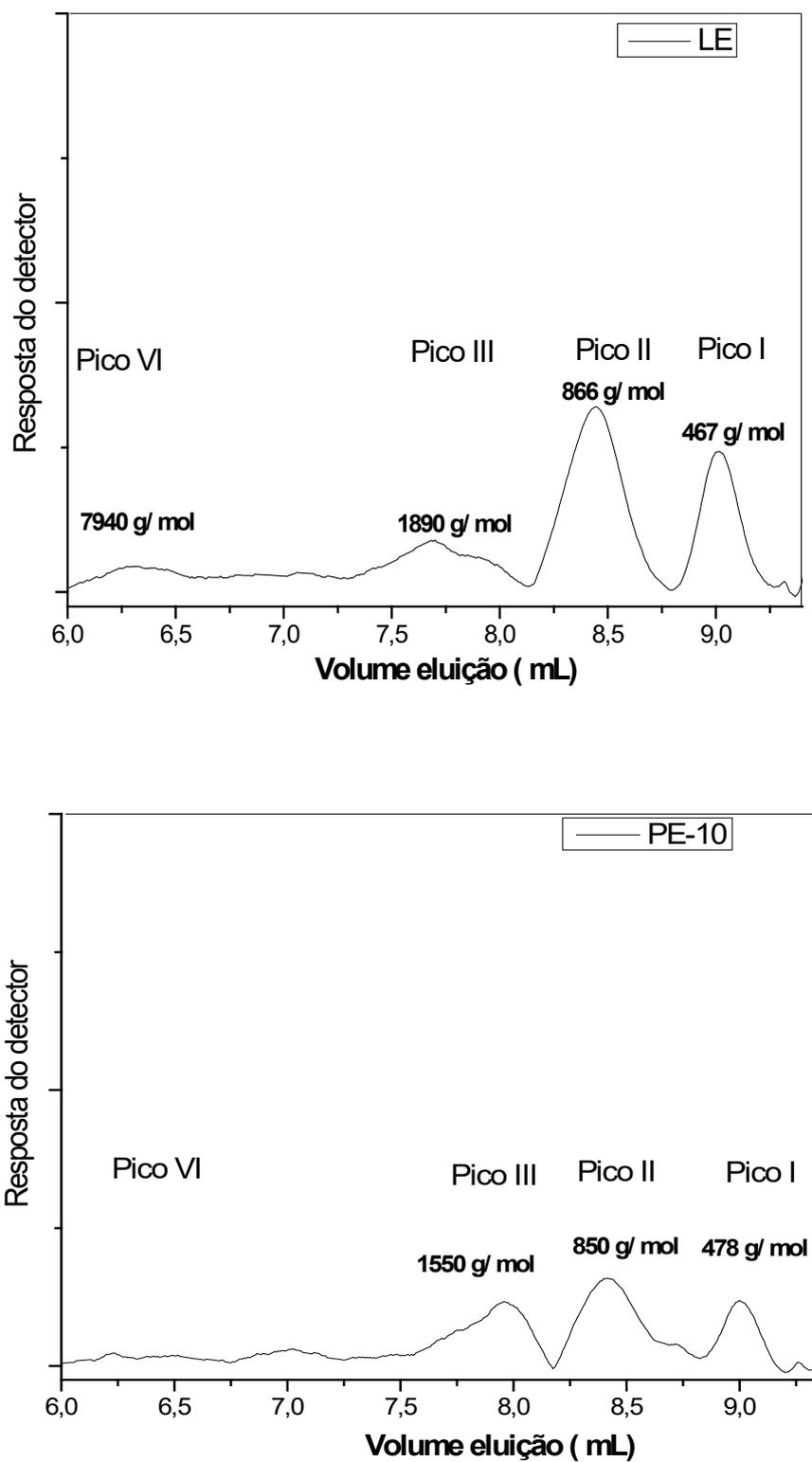
Hussin et al (2014) relatam que a auto hidrólise favorece a quebra das ligações entre as unidades da lignina, produzindo fragmentos menores e com baixa M_w . Segundo Gong *et al.* (2016) uma baixa massa molar e valores pequenos de

polidispersividade aumentam a reatividade, a solubilidade e favorecem as aplicações como antioxidantes, adesivos e tintas.

Observa-se nos cromatogramas da matéria-prima LE e do produto PE-10 que as principais modificações ocorreram entre os volumes de eluição de 7 a 8 mL (Figura 41). O pico III em 7,75 mL foi deslocado para 8,0 mL e a massa molar ponderal variou de 1890 g/mol para 1550 g/mol quando compara-se a matéria-prima LE em relação ao produto PE-10. De acordo com a Tabela 14, a principal variação ocorreu no aumento da porcentagem do pico III. Desse modo esses dados, indicam que as frações de menor massa reagiram preferencialmente.

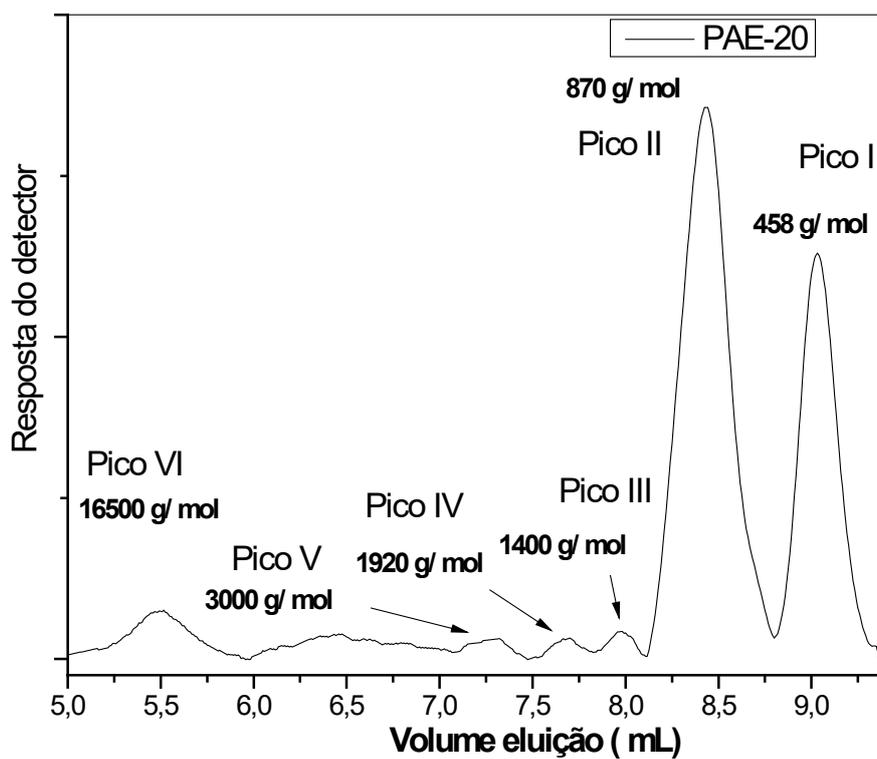
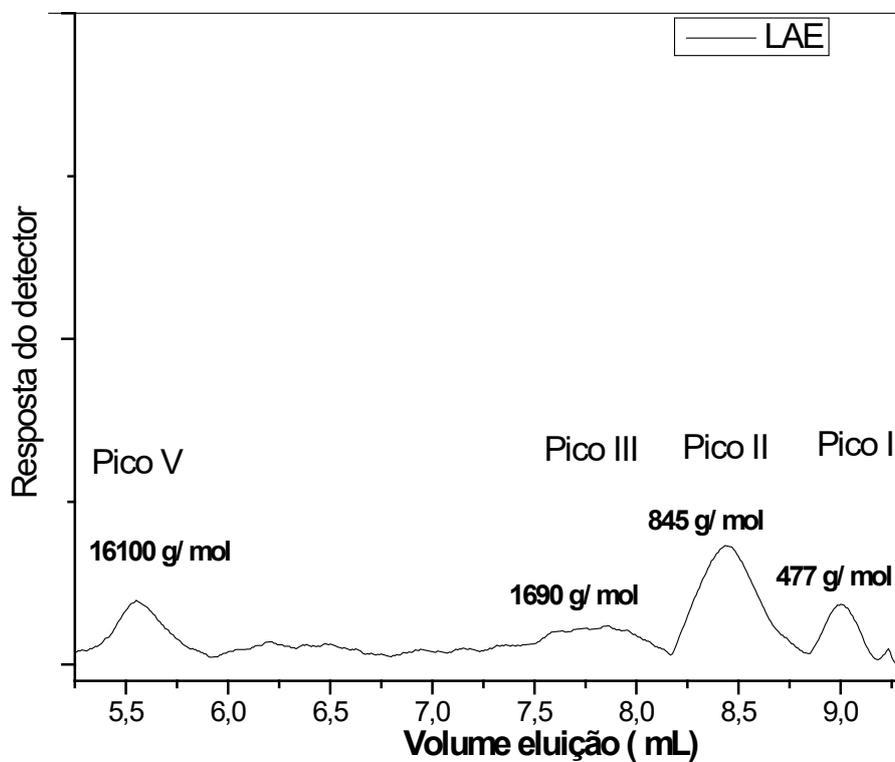
No caso da matéria-prima LAE, as severas condições da metodologia, favorecem tanto a fragmentação da lignina como também sua condensação o que corresponde ao surgimento de uma banda no cromatograma entre os volumes de eluição de 5,5 a 6 mL (Figura 42). Nos cromatogramas da matéria-prima LAE e do produto PAE-20 nota-se que as principais modificações ocorreram entre os volumes de eluição de 7,0 a 9,5 mL. Na matéria-prima LAE o largo pico entre 7,5 a 8,1 mL, pico III, com massa molar de 1690 g/mol dá origem a dois novos picos, III e IV, no produto PAE-20 próximos a 7,75 e 8 mL e com massa molar 1920 e 1400 g/mol, respectivamente. Além do surgimento de outro pico em 7,25 mL com massa molar de 3000 g/mol. O que sugere que a matéria-prima originou mais de um tipo de produto. Além disso, na Tabela 14 é notório o aumento da porcentagem dos picos I e II, que releva uma tendência já mencionada que as frações de menor massa molecular possuem menor impedimento estérico e logo maior reatividade.

Figura 41- Cromatogramas das ligninas LE e do produto PE-10.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 42- Cromatogramas da lignina LAE e produto PAE-20.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 14- Porcentagem dos picos dos cromatogramas

Amostras	Pico (%)					
	I	II	III	IV	V	VI
LE	35	47	13	-	-	4
PE-10	28	39	28	-	-	5
LAE	21	41	14	-	-	23
PAE- 20	38	51	3	2	2	5

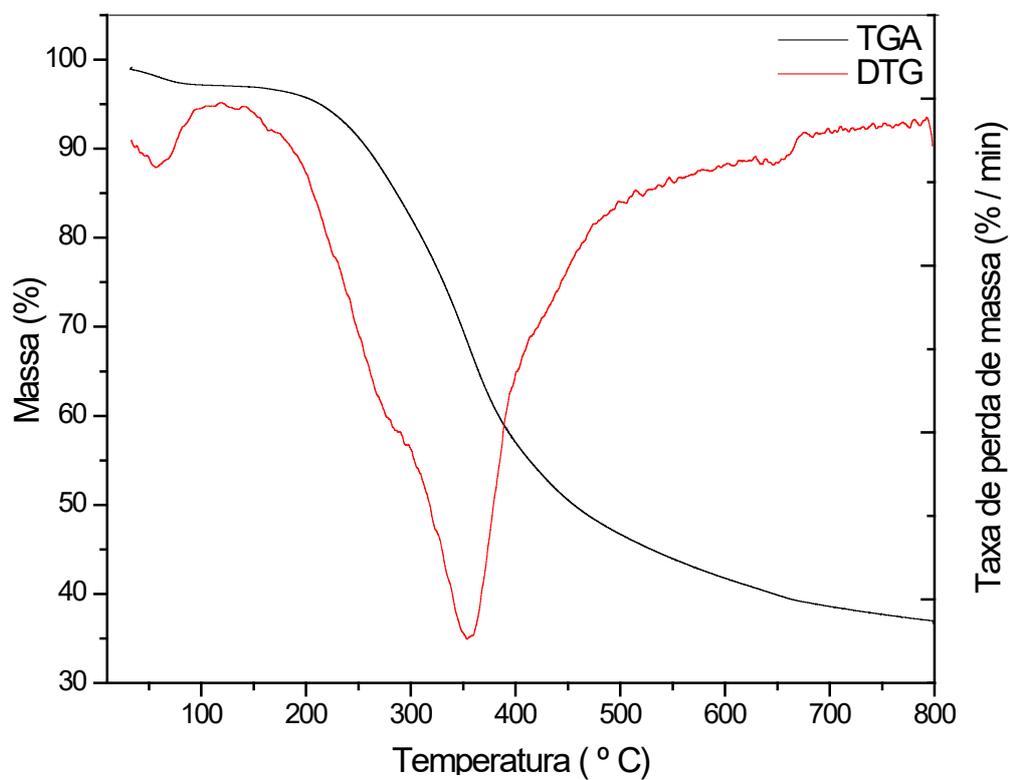
Fonte: elaborada pelo autor

6.9 Caracterização Térmica

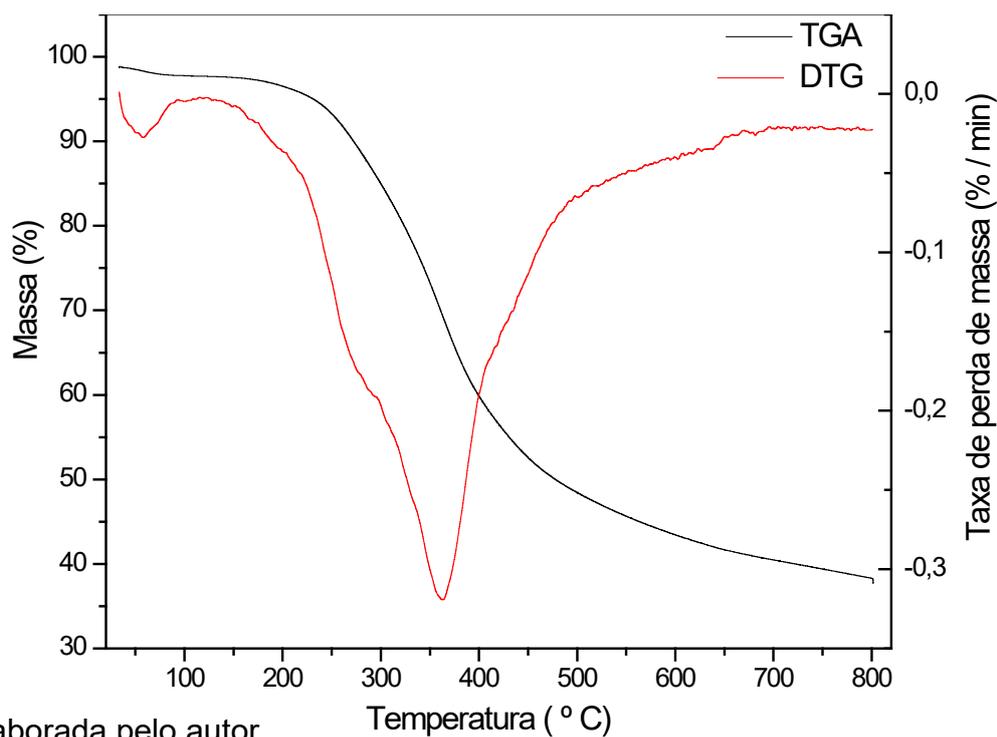
6.9.1 Análise termogravimétrica

A perda de massa inicial na lignina está relacionada com a perda de umidade, monóxido e dióxido de carbono (Figura 43). Próximo a 200 °C ocorre a degradação de hemiceluloses ligadas à estrutura da lignina. Na faixa de 300 a 400 °C ocorre a degradação das ligações presentes entre as unidades que formam a lignina. Entre 400 °C até 900 °C as reações de condensação dos anéis aromáticos são predominantes conforme relata HUSSIN *et al.* (2013).

Segundo Collarde e Blin (2014), a estabilidade térmica da lignina está relacionada com a grande variação de funções e ligações químicas. Desse modo, a degradação térmica ocorre em uma ampla faixa de temperatura, 200 a 500 °C, com uma taxa máxima entre 360 e 400 °C. A estabilidade térmica do produto PE-10 aumentou em relação à matéria-prima, mas para o produto PAE-20 diminuiu (Figuras 43, 44, 45 e 46).

Figura 43 - TGA e DTG da amostra LE em N₂.

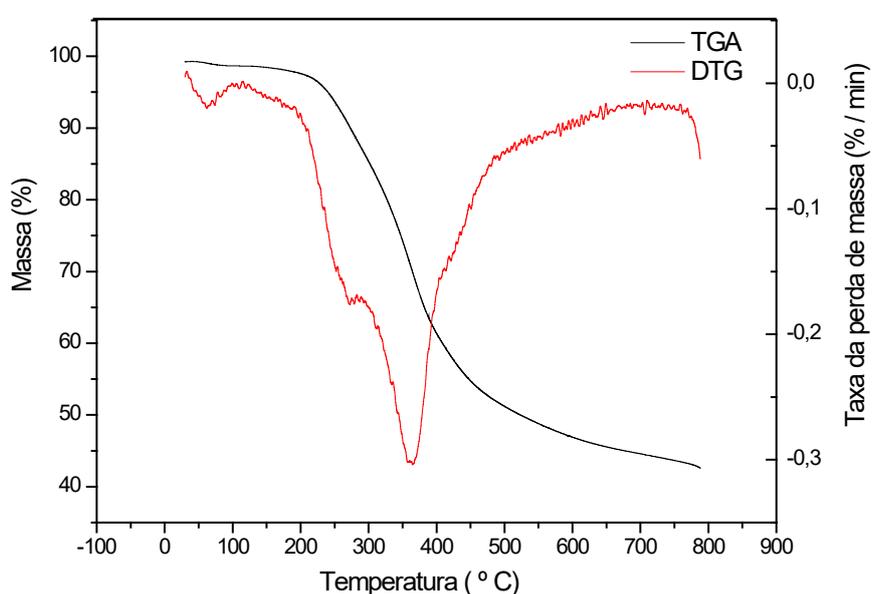
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 44 - TGA e DTG da amostra LAE em N₂.

Fonte: elaborada pelo autor

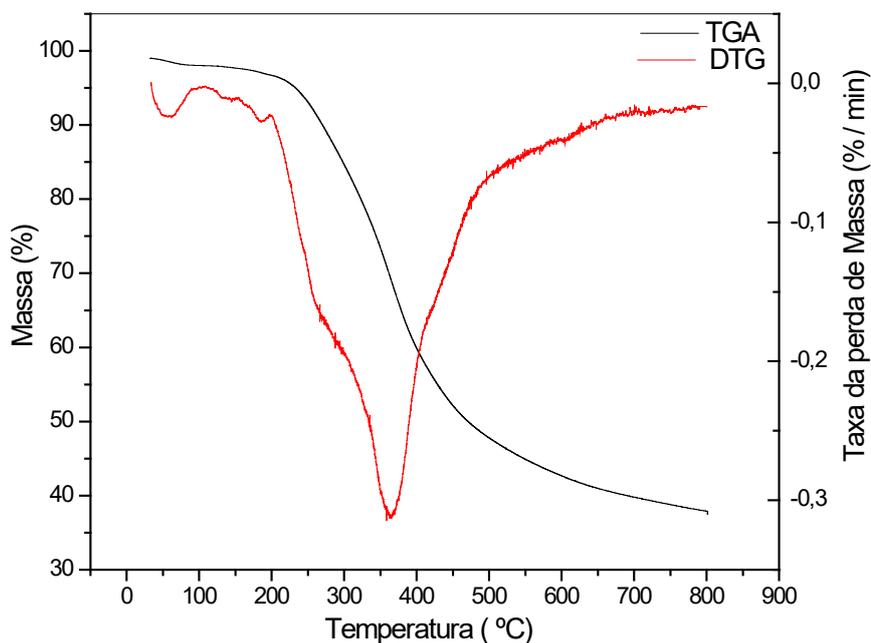
Em temperaturas maiores que 300 °C ocorre a quebra das ligações C-C das cadeias alquílicas nas unidades monoméricas. São essas reações que causam a quebra da ligação entre as ramificações e os anéis aromáticos causando a máxima taxa de decomposição da lignina (de 360 a 400 °C). Entre 500 e 800 °C grande parte das ligações iniciais dos monômeros foram quebradas restando apenas ligações fenil 5-5, éter 4-O-5 e substituintes hidroxilas. A ruptura das ligações éter ocorre por meio de uma hidrogenação, o que torna a ligação mais reativa (COLLARDE; BLIN, 2014).

Figura 45 - TGA e DTG da amostra PE-10 em N₂.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 46 - TGA e DTG da amostra PAE-20 em N₂.



Fonte: elaborada pelo autor

6.9.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

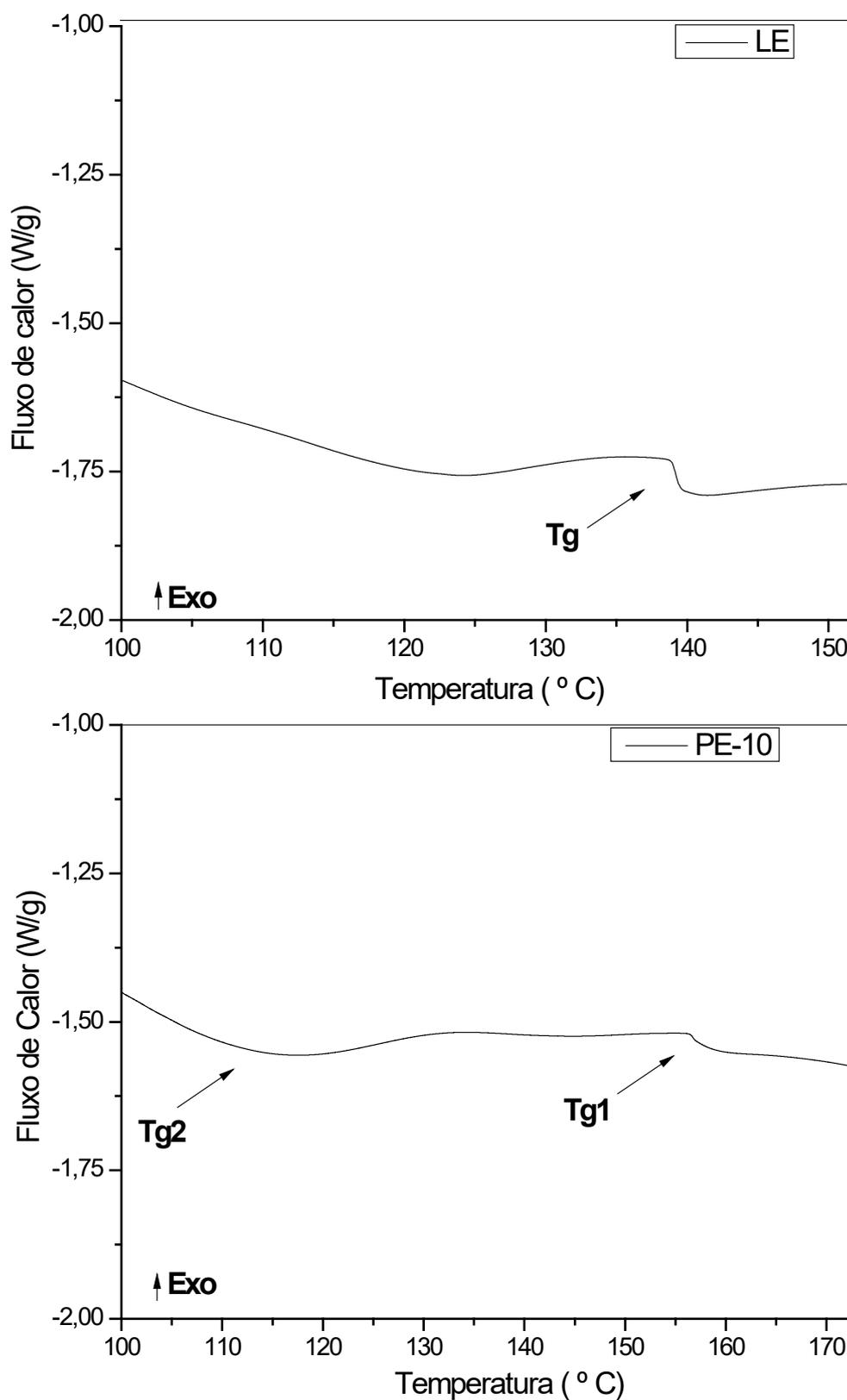
A temperatura de transição vítrea (T_g) é a temperatura acima da qual o movimento das moléculas começa. A esta temperatura há uma mudança de um estado vítreo para um estado "plástico" no caso dos polímeros. Conforme relatam Cao e Lin, (2003), geralmente, os maiores fatores que afetam a T_g dos polímeros são a rigidez (mobilidade) e forças intermoleculares das cadeias poliméricas. A mobilidade das cadeias poliméricas é afetada principalmente pelos obstáculos que impedem a rotação ao redor das ligações carbono-carbono. Isso, por sua vez, é determinado principalmente pelo tamanho dos grupos substituintes nos átomos de carbono dessas cadeias. Em outras palavras quanto maior o grupo substituinte maior a temperatura de transição vítrea.

Desse modo polímeros que apresentam maiores grupos substituintes nas cadeias poliméricas têm maior resistência ao movimento, sendo necessária maior quantidade de energia, o que aumenta os valores de T_g . Esse comportamento é denominado efeito de ancoragem (CAO; LIN, 2003).

Conforme as Figuras 47 e 48 a lignina LE, PE-10, LAE e PAE-20 apresentaram T_g em 140, 156, 150 e 153 °C, respectivamente. O aumento na T_g dos produtos pode ser atribuído às substituições no anel aromático da lignina que favorecem o efeito de ancoragem (CAO; LIN, 2003).

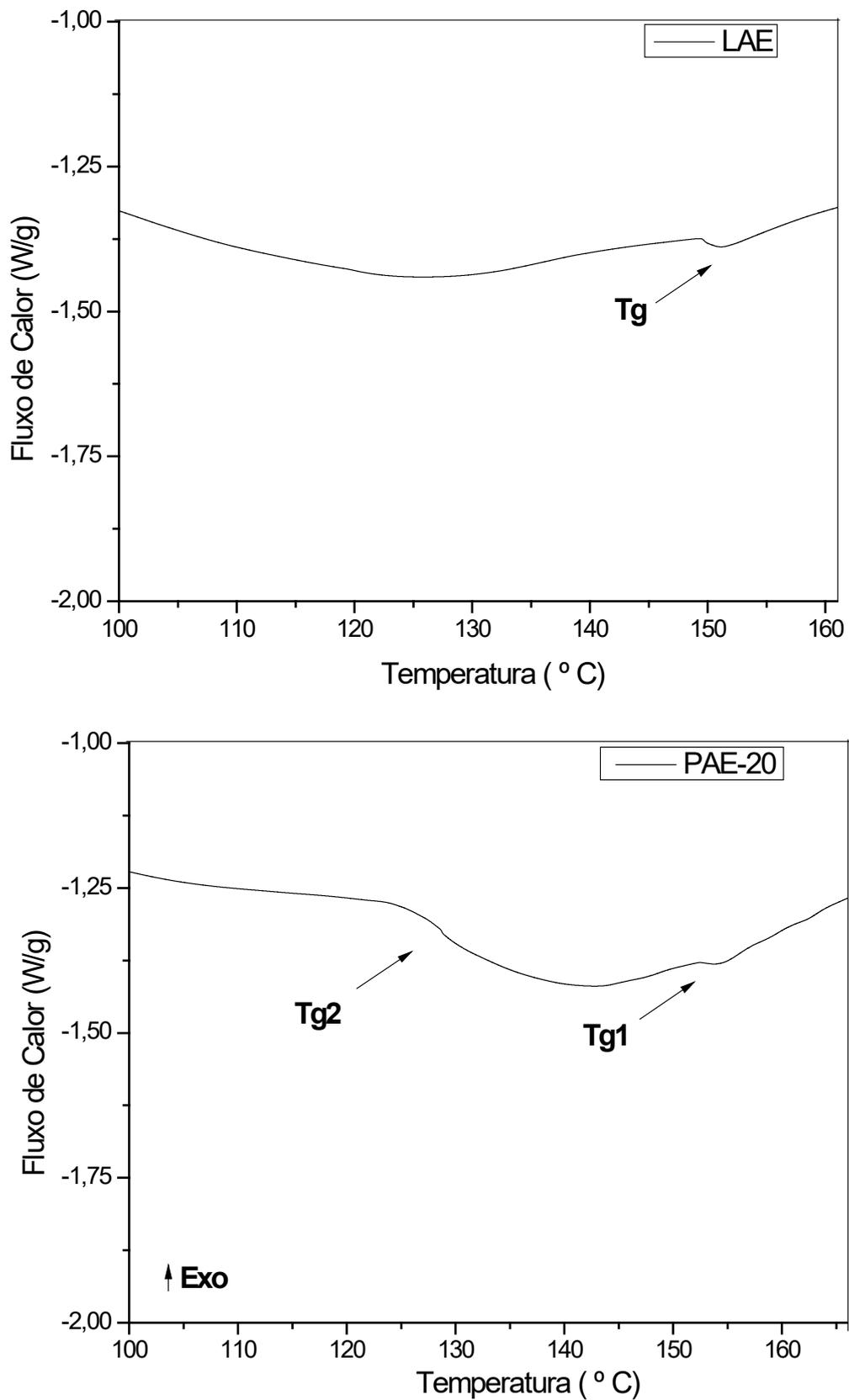
Em produtos formados pela fração de menor massa molecular os efeitos ancoragem são preponderantes aumentando os valores da T_g (T_{g1}) (EL MANSOURI, YUAN e HUANG, 2011). Já para os produtos de maior massa molecular os volumosos grupos terc-butila diminuem o empacotamento das cadeias poliméricas desse modo aumenta o volume livre e diminui a temperatura da t_g de uma fração dos produtos (T_{g2}) (HATAKEYAMA, HATAKEYAMA, 2009). O que explica os dois valores de T_g s presentes nos gráficos para os produtos (Figuras 47 e 48).

Figura 47 - DSC da matéria-prima LE (acima) e produto PE-10 (abaixo).



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 48 - DSC da matéria-prima LAE (acima) e produto PAE-20 (abaixo).



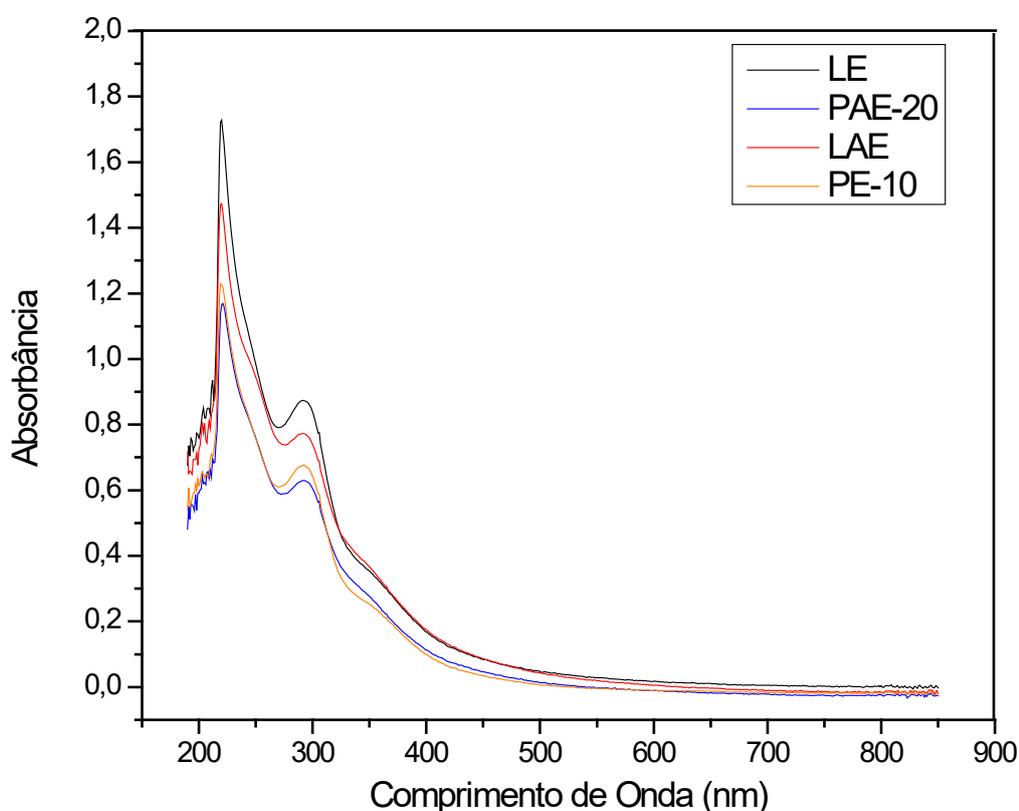
Fonte: elaborada pelo autor

6.10 Espectroscopia de absorção na região de UV-VIS

Segundo Lu e Ralph (2014), a habilidade da lignina absorver luz na região do ultravioleta é oriunda do elevado grau de conjugação do núcleo aromático. A presença de grupos éter e hidroxila contribui significativamente para o máximo da absorbância em 280 nm. O espectro UV-vis depende das características de cada lignina e das condições da análise. Ligninas do tipo G apresentam um máximo de absorção em torno de 280 nm, referente a transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel aromático, um ombro em 230 nm e um pico intenso em 200-210 nm. Ligninas do tipo S apresentam o máximo de absorção na região de 268-277 nm (OLIVEIRA, 2015)

A Figura 49 apresenta bandas no espectro UV-vis que é característico de ligninas do tipo G, também é notória a redução das intensidades de absorção em relação aos produtos alquilados (Tabela 15).

Figura 49 - Espectro UV-vis matéria-prima e produtos em dioxano [0,5 mg/mL].



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 15: Absorbância dos principais picos do espectro UV- vis.

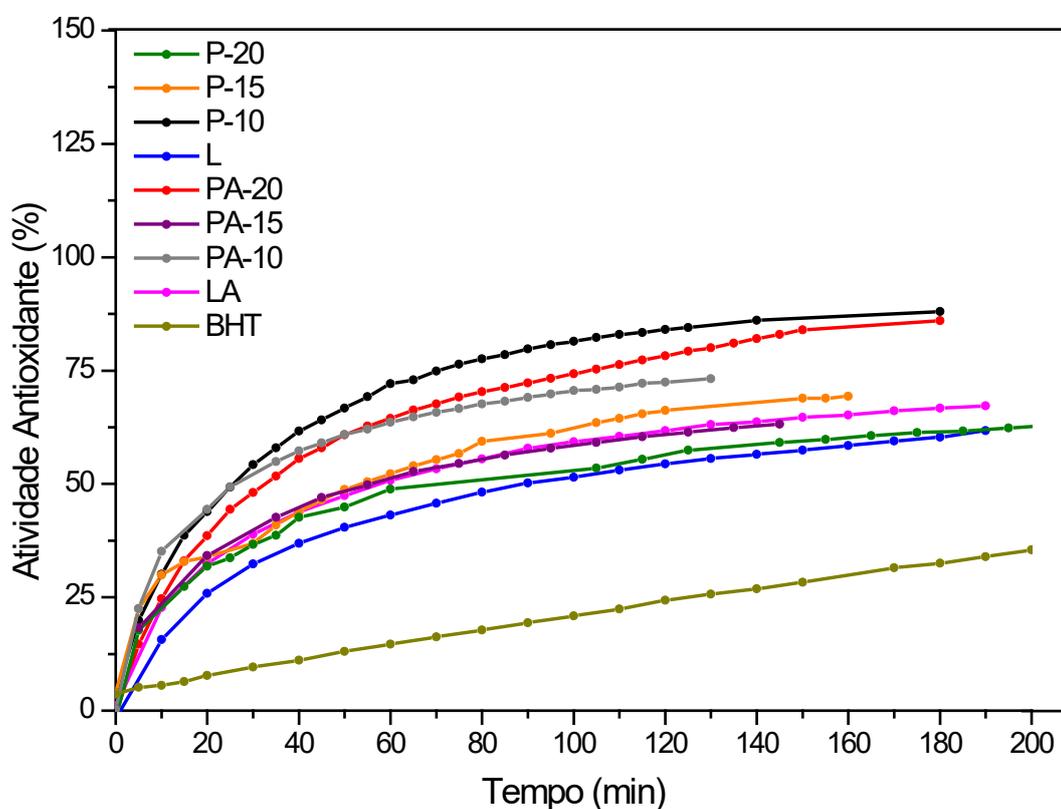
Amostras	220 nm	280 nm
LE	1,74	0,87
PE-10	1,22	0,67
LAE	1,47	0,77
PAE- 20	1,16	0,63

Fonte: elaborada pelo autor

6.11 - Atividade antioxidante da lignina

A Figura 50 apresenta a porcentagem de redução do radical (DPPH•) em função do tempo. Todas as soluções possuem a concentração de 3 mg/mL. A Tabela 16 apresenta os valores da IC₅₀ para as amostras calculados segundo Rufino *et al.* (2007).

Figura 50- Atividade antioxidante das amostras.



Fonte: elaborada pelo autor

Para a lignina obtida com o uso da auto-hidrolise LA, a IC₅₀ foi 22% menor que a obtida pelo processo acetossolve convencional L, o que indica que a auto-hidrolise foi responsável por esse aumento significativo na atividade antioxidante, uma vez que quanto menor a IC₅₀ maior é atividade antioxidante (Tabela 16).

O produto alquilado PE-10 teve uma IC₅₀ 46% inferior ao material de partida L. Já o produto PA-20 teve a menor IC₅₀ de todas, sendo 25% inferior ao material de partida LA. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante superior ao antioxidante comercial BHT. A literatura relata os seguintes valores de IC₅₀ para alguns tipos de lignina 23,7 ± 0,9 µg/mL (Aminzadeh *et al.*, 2018), 42,8 ± 1,0 µg/ mL (Arshanitsa *et al.*, 2013).

As amostras (L, P-10, LA, PA-20) foram submetidas ao processo de remoção de extrativos e apresentaram redução significativa nos valores da IC₅₀. Fato esse que pode ser atribuído tanto a maior pureza do material como as interações entre o DPPH e os ácidos graxos das amostras.

Tabela 16 – IC₅₀ das amostras

Amostras	IC ₅₀ (µg/ mL)	Amostras Sem extrativos	IC ₅₀ (µg/ mL)
L	49,00 ± 1,80	LE	30,00 ± 5,65
P-10	26,40 ± 0,56	PE-10	17,06 ± 0,98
LA	38,25 ± 1,06	LAE	20,10 ± 0,85
PA-20	29,05 ± 0,35	PAE-20	5,00 ± 0,23
BHT	72,50 ± 2,00	BHT	—

Fonte: elaborada pelo autor

A atividade antioxidante das amostras também foi determinada pelos métodos ABTS, FRAP e expressa em valores TEAC, que é definido como a concentração de Trolox que possui a mesma atividade que 1 mM da substância antioxidante investigada. Para isso foram usadas as curvas de calibração para o método ABTS (Figura 16) e FRAP (Figura 17). Todos os produtos alquilados PE-10 e

PAE-20 também apresentaram um aumento da atividade antioxidante em relação à matéria-prima de partida LE e LAE, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17 – Atividade antioxidante pelos métodos FRAP e ABTS.

Amostras	FRAP ($\mu\text{M trolox /g}$)	ABTS ($\mu\text{M trolox / g}$)
LE	257 \pm 9	260 \pm 23
PE-10	331 \pm 3	325 \pm 27
LAE	237 \pm 4	639 \pm 43
PAE-20	250 \pm 2	723 \pm 33

Fonte: elaborada pelo autor

Segundo Lu *et al.* (2012), a atividade antioxidante da lignina está relacionada com a quantidade de hidroxilas fenólicas e na habilidade de formar radicais fenoxi estáveis após a doação de um hidrogênio. De um modo geral, a presença de hemiceluloses tem um efeito negativo no potencial antioxidante, devido à formação de ligações de hidrogênio com a lignina, o que impede a doação dos átomos de hidrogênio (LI *et al.*, 2012).

Desse modo, a elevada atividade antioxidante das amostras está relacionada ao elevado teor de hidroxilas fenólicas (Tabela 7), aos baixos valores de Mw, Mn e IP, aos sinais dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC e aumento nas razões das bandas 1230/1515, 1375/1515, 2928/1515 do FTIR (Tabela 11).

Os diminutos valores da IC₅₀ dos produtos obtidos evidenciam uma elevada atividade antioxidante a ínfimas concentrações. Somado a isso tem-se o caráter não tóxico da lignina (VINARDELL *et al.*, 2008). Desse modo, aplicações como cosméticos, produtos farmacêuticos bloqueadores de radiação UVA e UVB, prevenção de doenças derivadas do estresse oxidativo e na indústria alimentícia são possíveis aplicações para esse tipo de lignina (MORGANTI e STOLLER, 2017).

Os valores da atividade antioxidante obtidos pelos diferentes métodos variam em função das suas características. Desse modo, a atividade antioxidante deve ser determinada por diferentes métodos que utilizam mecanismos variados

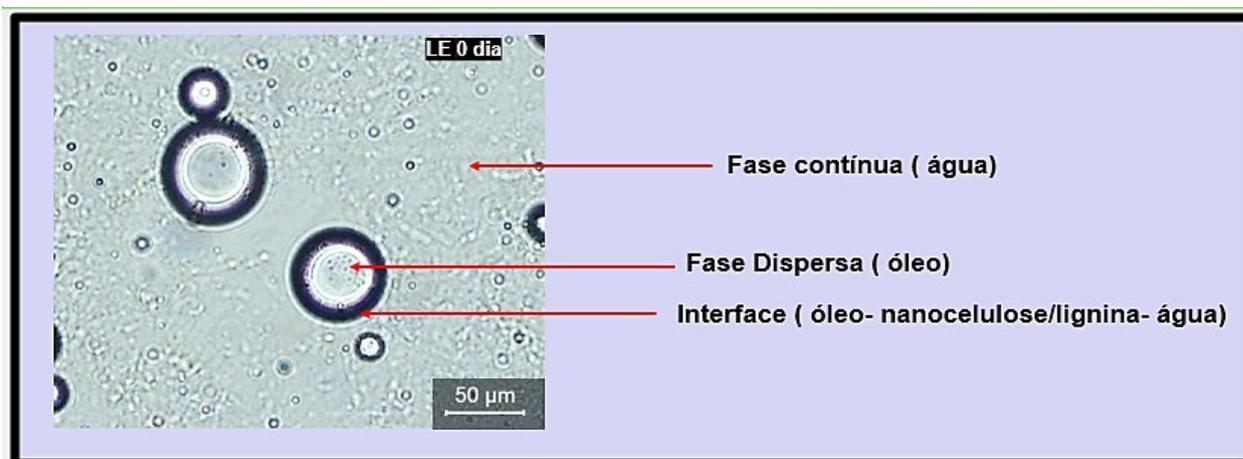
(GIADA, 2014). Embora os diversos métodos antioxidantes venham sendo estudado exaustivamente pela literatura, nenhum único método pode ser indicado como o mais eficiente para determinar atividade antioxidante (MAREČEK et al. 2017).

Özyürek et al. (2008) relatam que antioxidantes lipofílicos tais como o BHT quando em meio aquoso apresentam níveis de turbidez que podem comprometer análise. Já o método DPPH possui grande afinidade por antioxidantes lipofílicos. Embora os reagentes FRAP e Folin sejam extensamente utilizados, apenas os métodos ABTS e CUPRAC são adequados para antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos. Logo os valores da atividade antioxidante do BHT pelo método FRAP não foram determinados pelos motivos supramencionados.

6.12 Emulsões de Pickering das Amostras

As microscopias óticas digitais comprovam que foi possível obter uma emulsão de Pickering. A Figura 51 descreve os seus principais componentes.

Figura 51 - Principais componentes da emulsão de Pickering.



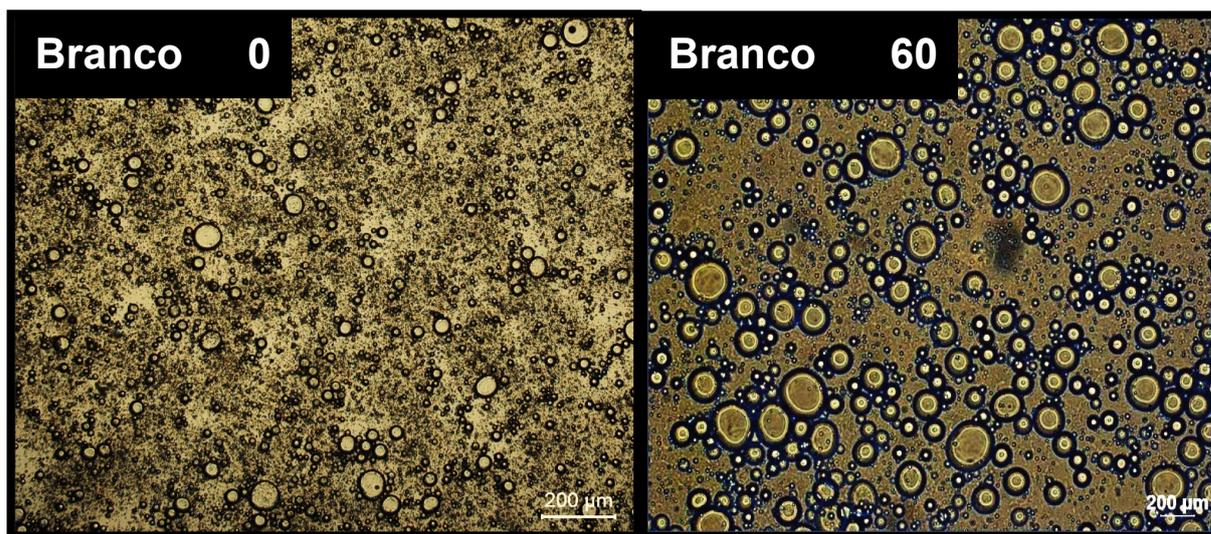
Fonte: elaborada pelo autor

Conforme observado nas Figuras 52 e 53, a distribuição da porcentagem das frequências das gotas pelo respectivo diâmetro tanto em 0 quanto em 60 dias apresentou um perfil polimodal. Também é perceptível que algumas gotas sofreram coalescência ao longo do período, tanto pelo aumento da porcentagem de gotas com maior diâmetro quanto pelas micrografias.

Segundo Chevalier e Bolzinger (2013), emulsão de óleo dispersas por Ultra-Turrax com rotações na faixa de 10000 a 20000 rpm no tempo de 10 min, ou seja,

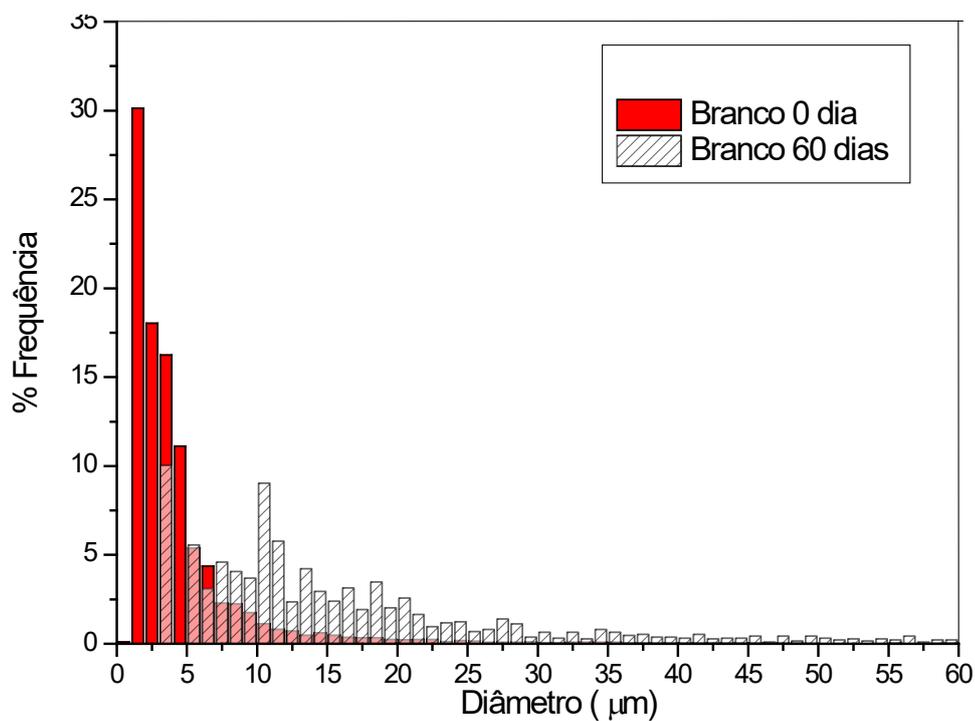
condições semelhantes às usadas nesse trabalho, produzem gotas com diâmetros variando entre 2 a 5 μm .

Figura 52 - Micrografia da emulsão do Branco após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 53 - Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão do branco após 0 e 60 dias de armazenamento.

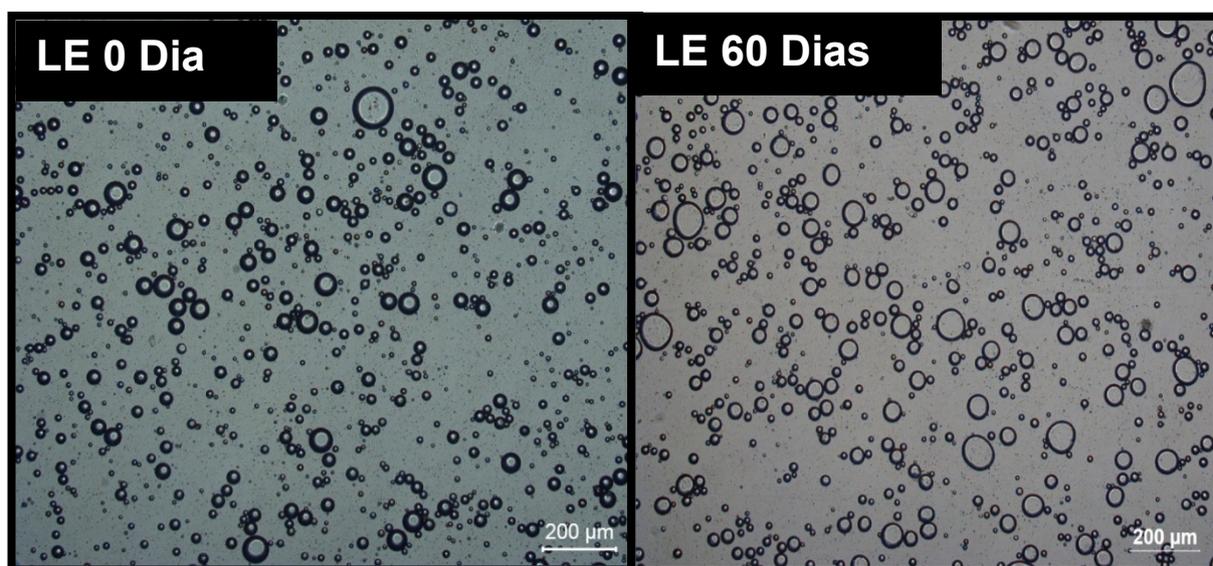


Fonte: elaborada pelo autor

Na emulsão do branco com 0 dias de armazenamento uma estreita distribuição do diâmetro das gotas é observada onde aproximadamente 75 % do total de gotas possui um diâmetro menor ou igual a 5 μm . No entanto, embora não tenha ocorrido separação de fase houve um grande aumento no diâmetro das gotas ao longo de 60 dias de armazenamento. (Figura 53)

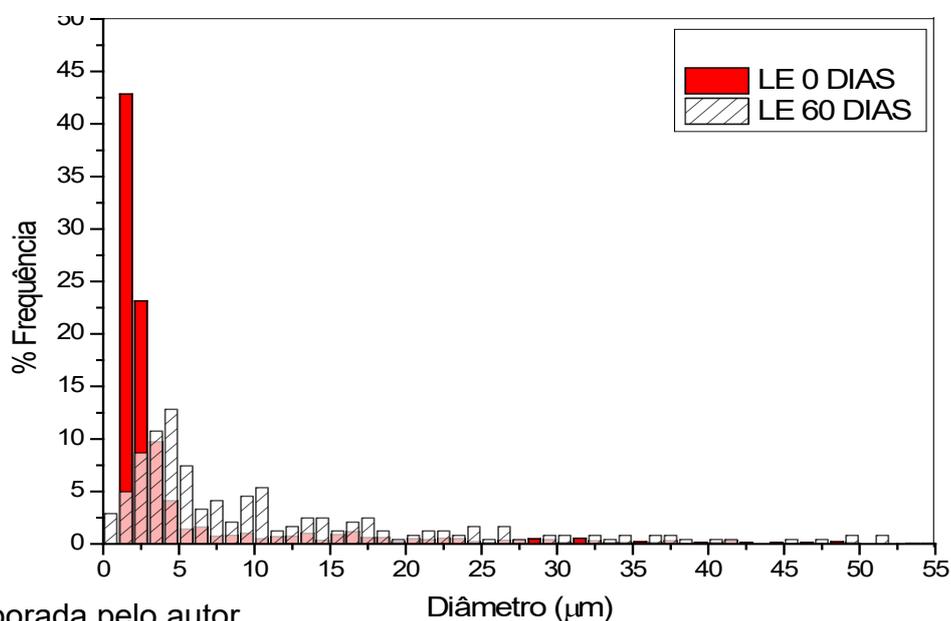
A adição da lignina tipo LE a emulsão para 0 dias de armazenamento também possui uma distribuição de tamanhos estreita com 80 % do total de partículas com diâmetro menor ou igual a 5 μm (Figura 55). A emulsão após processamento no ultra-turrax possui um elevado número de minúsculas gotas. No entanto ao longo dos 60 dias de armazenamento sofreram coalescência com o respectivo aumento no diâmetro passando a ter apenas 40 % do total de partículas com diâmetro menor ou igual a 5 μm . Esse aumento no diâmetro pode ser atribuído a um maior tempo que as gotas levaram para serem recobertas pela celulose nanofibrilada, ou seja, atingir o limite da coalescência (Kalashnikova *et al.*, 2011). Tendo em vista que a celulose nanofibrilada atua como uma barreira para a coalescência. Na Figura 54 também se torna visível o aumento do tamanho das gotículas.

Figura 54 - Micrografia da emulsão LE após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

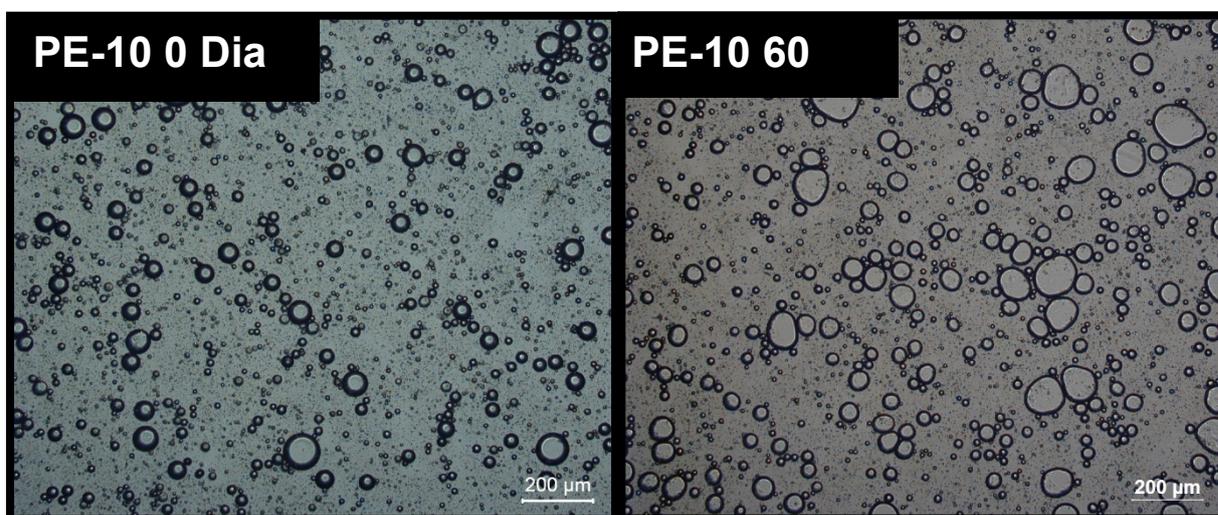
Figura 55 - Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão LE após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

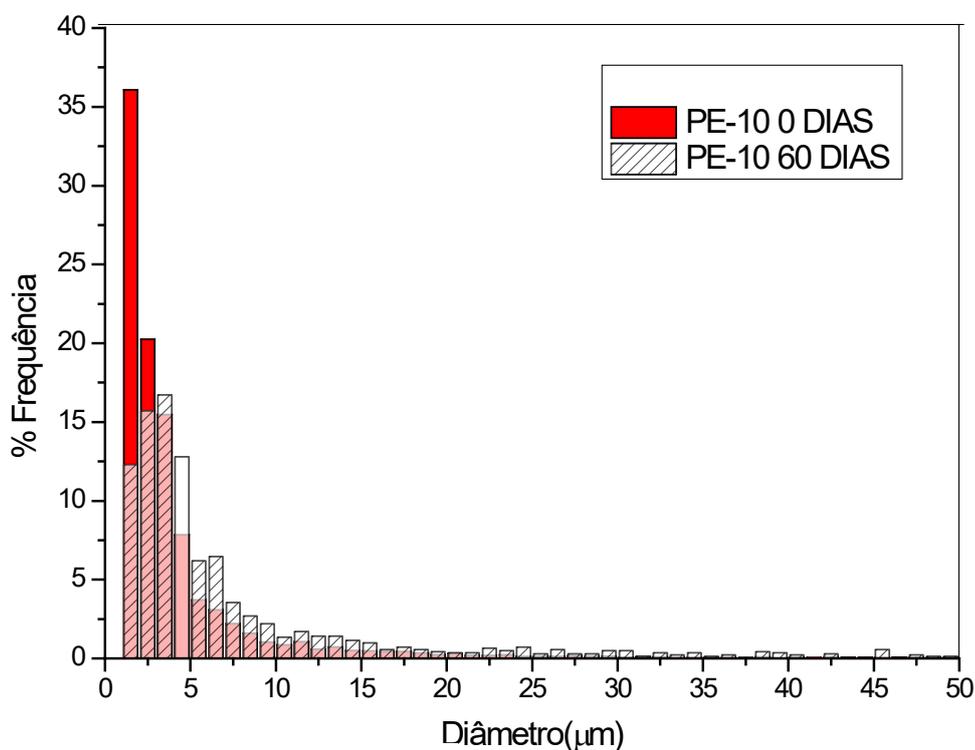
Para o produto alquilado PE-10 adicionado a emulsão para 0 dias de armazenamento também possui uma distribuição de tamanhos estreita com 80 % do total de partículas com diâmetro menor ou igual a 5 µm (Figura 57). Já para 60 dias de armazenamento esse valor caiu para 57 % do total de partículas com diâmetro menor ou igual a 5 µm. Na Figura 56 também se torna visível o aumento do tamanho das gotas. Esse tipo de emulsão é mais estável para 60 dias de armazenamento uma vez possui gotas menores que a da lignina LE.

Figura 56 - Micrografia da emulsão PE-10 após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

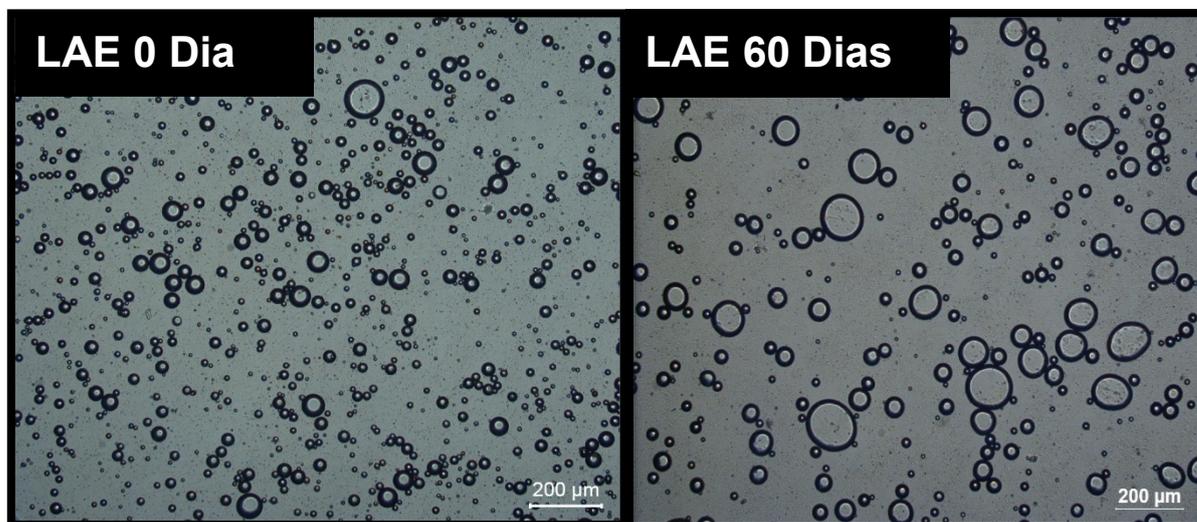
Figura 57 - Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão PE-10 após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

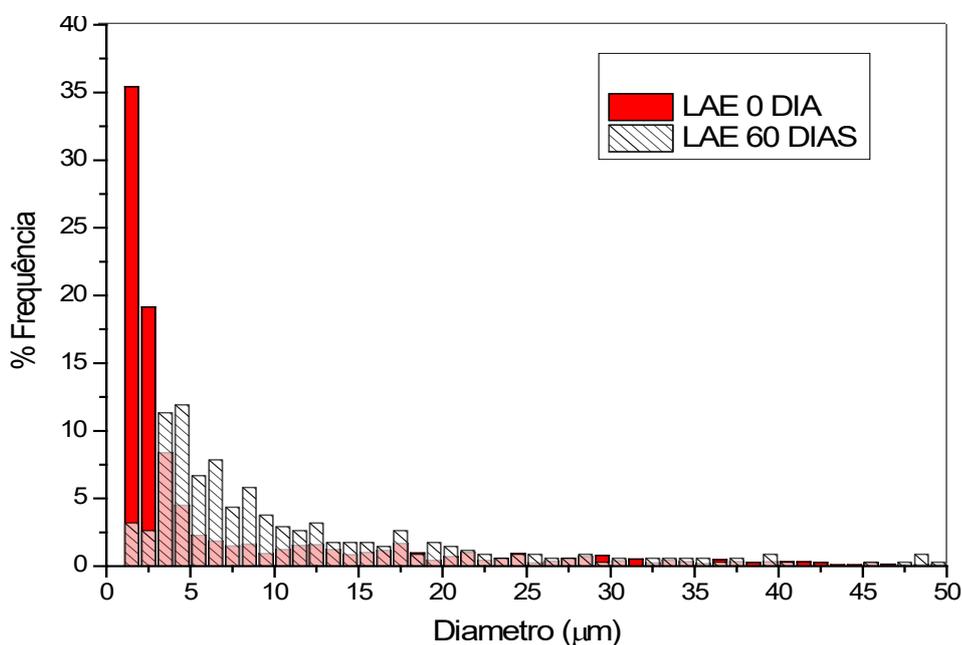
A adição da lignina tipo LAE a emulsão para 0 dias de armazenamento possui uma distribuição de tamanhos com 67 % do total de partículas com diâmetro menor ou igual a 5 μm (Figura 59). No entanto o tempo de armazenamento aumentou o tamanho das gotas, com apenas 30 % do total de partículas com diâmetro menor ou igual a 5 μm. Na Figura 59 também se torna visível o aumento do tamanho das gotas.

Figura 58 - Micrografia da emulsão LAE após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

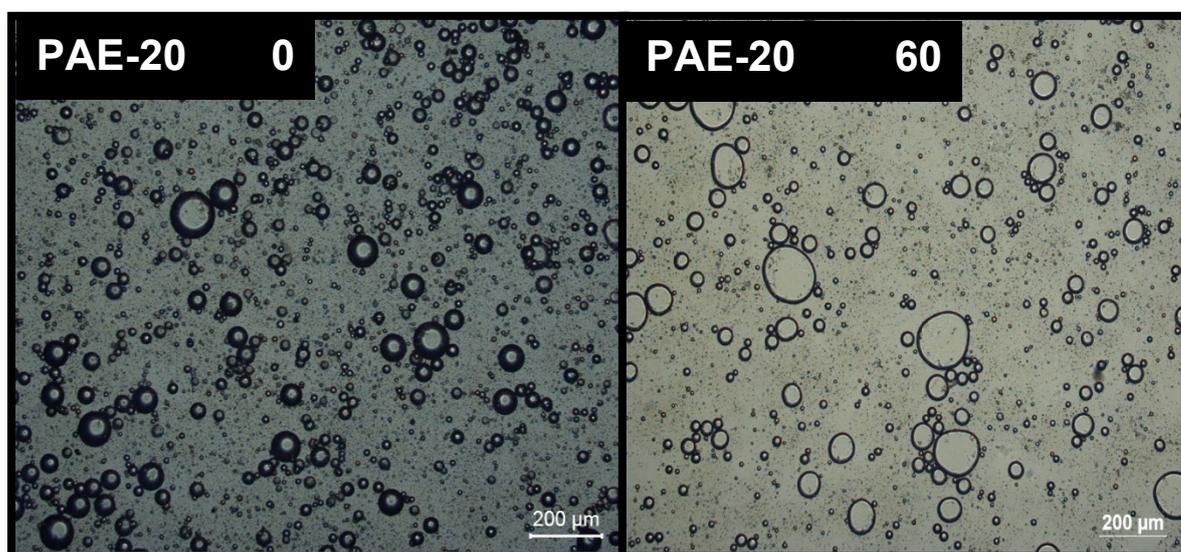
Figura 59 - Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão LAE após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

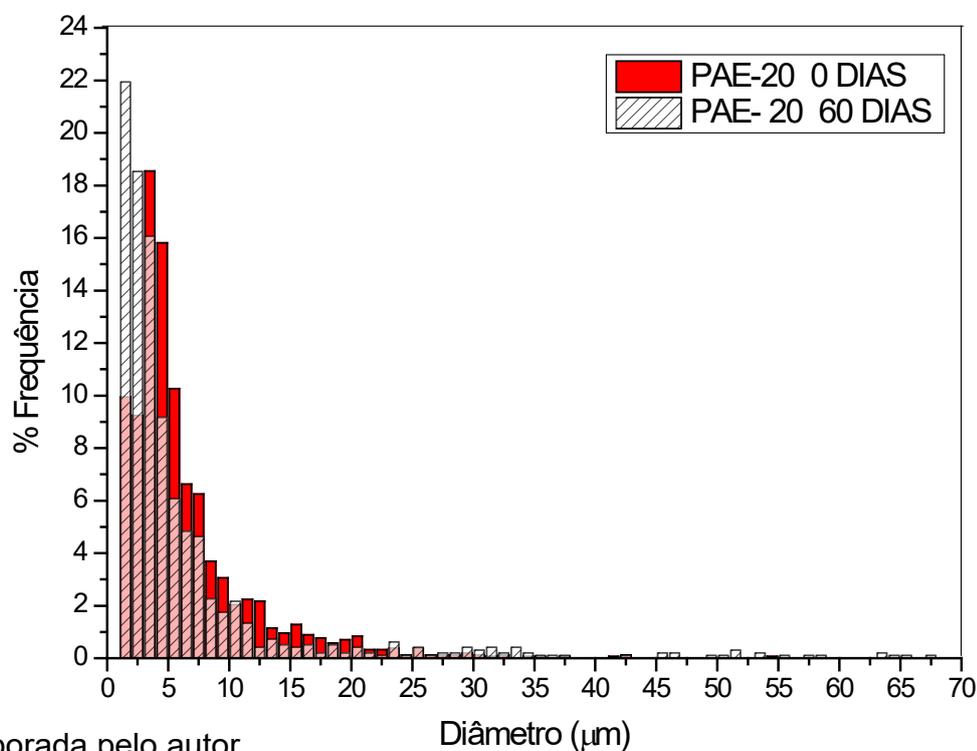
A emulsão com o produto alquilado PAE-20 para 0 dias de armazenamento possui uma distribuição de tamanhos com 58 % do total de partículas com diâmetro menor ou igual a 5 µm (Figura 61). Já para 60 dias de armazenamento essa fração aumentou para 65 %, desse modo o produto alquilado diferentemente do material de partida LAE manteve a estabilidade das gotas ao longo do período. Um aumento do tamanho das gotas também é visível na Figura 60.

Figura 60 - Micrografia da emulsão PAE-20 após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 61 - Gráfico da frequência pelo diâmetro das gotas da emulsão PAE-20 após 0 e 60 dias de armazenamento.



Fonte: elaborada pelo autor

A Tabela 18 apresenta uma redução do diâmetro médio (D_{32}) para 0 e 60 dias em relação ao branco (azeite de oliva e celulose bacteriana nanofibrilada oxidada). Para as emulsões as quais foram adicionadas tanto lignina quanto o produto alquilado, essa redução pode ser um indicativo de que esses compostos atuaram estabilizando a emulsão conforme já mencionando na literatura (LI *et al.*, 2020; BERTOLO *et al.*, 2019; DAI *et al.*, 2019).

O aumento do diâmetro ao longo do período de armazenamento de 60 dias, reforça o comportamento observado tanto nas micrografias quanto na distribuição do diâmetro das gotas mencionados anteriormente.

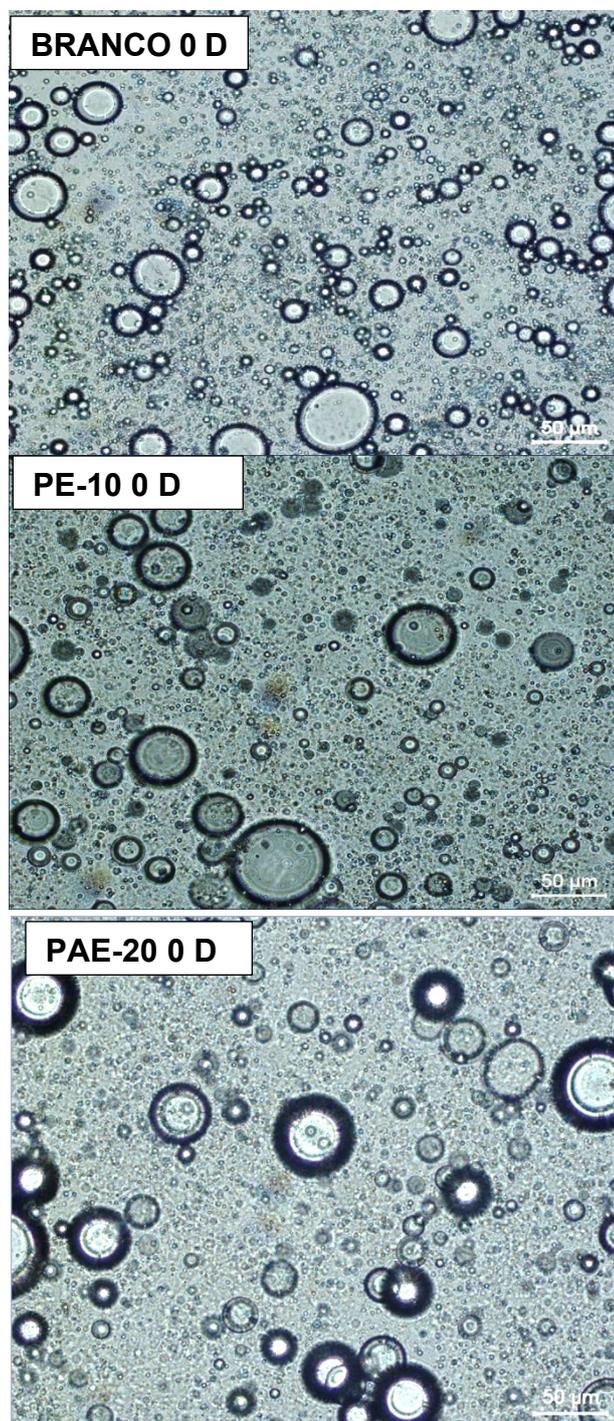
Tabela 18- Cálculo do diâmetro médio (D_{32}) para as amostras.

Amostras	D_{32} 0 dias	D_{32} 60 dias
BRANCO	25,5	40,5
LE	24,3	31,0
PE-10	17,5	32,5
LAE	26,0	34,0
PAE-20	18,0	32,0

Fonte: elaborada pelo autor

Além disso, observa-se na Figura 62, que o contorno ou interface das emulsões com adição dos produtos PE-10 e PAE-20 em relação a emulsão do branco tornam-se mais espessos. Esse fato reforça hipótese anterior que as amostras e especialmente os produtos alquilados atuam na interface das gotas aumentando a estabilidade das emulsões o que favorece diversas aplicações como em cosméticos.

Figura 62 - Comparação entre emulsão do branco e com adição das amostras.



Fonte: elaborada pelo autor

6.12.1 Ângulo de contato do azeite, celulose bacteriana(CBNOX) e amostras

Observa-se na Tabela 19 que o ângulo de contato das amostras diminuiu principalmente em relação aos produtos alquilados. A variação ocorreu entre 21 e 47° sendo os valores para o produto PAE-20 e água, respectivamente. Desse modo as gotas de azeite tornaram-se mais hidrofílicas. Sugere-se que a explicação para esses resultados pode ser devido aos produtos terem sido formados pelas frações de menor massa molecular da lignina. Logo são mais hidrofílicos o que reduz o valor dos ângulos de contato (NAKAGAME *et al.*, 2010).

Bertolo *et al.* (2019) relataram que esse caráter hidrofílico tende a interagir preferencialmente com a fase aquosa formando uma camada adsorvente em direção às gotículas de óleo, que caracteriza a emulsão como sendo óleo em água (O/A). Nesse tipo de emulsão o ângulo de contato deve variar entre 15 a 90 °. Bertolo *et al.* (2019) descrevem valores variando entre 17 a 56 ° para nanopartículas de lignina.

Essa informação é corroborada por Pichot, Spyropoulos, Norton, (2012) que citam que adsorção na interface óleo/água depende da afinidade da partícula por ambas as fases. Partículas muito hidrofílicas (ângulo de contato entre 0 e 10 °) permanecem na fase aquosa. Ao passo que as muito hidrofóbicas (170 e 180 °) permanecem em fase óleo.

Tabela 19- Ângulo de contato das amostras.

Amostras	Ângulo de contato (graus)
Água	47 ± 2
Azeite de oliva	33 ± 1,7
CBNOX	29 ± 2,7
LE	26 ± 1,2
PE-10	23 ± 1,1
LAE	27 ± 1,6
PAE-20	21 ± 1,2

Fonte: elaborada pelo autor

A relação entre o ângulo de contato e as tensões superficiais, matematicamente, é descrita pela equação de Young (9), que pode ser apresentada na forma abaixo (SUBEDI, 2011):

$$\gamma_l = \frac{\gamma_s - \gamma_{sl}}{\cos\theta} \quad (9)$$

Onde:

γ_s é a tensão interfacial sólido/gás,

γ_l é a tensão interfacial líquido/gás

γ_{sl} é a tensão interfacial sólido/líquido

θ ângulo de contato entre o líquido e superfície sólida

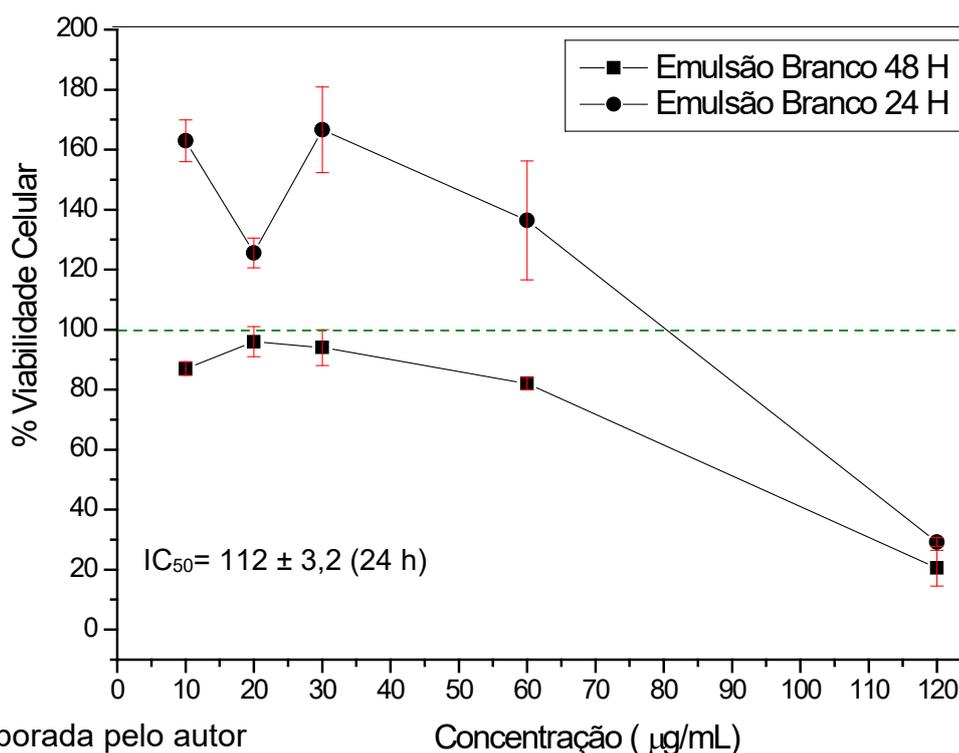
A equação 9 foi propositalmente rearranjada para que seja analisada a influência do ângulo de contato na tensão interfacial líquido. Desse modo, quanto menor o ângulo de contato maior será o valor do $\cos\theta$ apresenta. Logo menor será a tensão interfacial líquido (γ_l). Outra forma de visualizar é partindo do princípio que um

líquido de com elevado valor de γ , possui moléculas tão fortemente ligadas entre si que não irão interagir com a superfície do sólido. A gota não molha o sólido, permanece no formato esférico e tem elevado ângulo de contato. Para contrabalancear essa tendência deve-se usar uma substância que reduza a tensão superficial do líquido (emulsificante) ou aumenta a energia interfacial do sólido. Portanto supõe-se que a adição das amostras reduziu a tensão superficial do azeite favorecendo assim a estabilidade das emulsões.

6.13 Ensaio de citotoxicidade do Alamar Blue®

Esses ensaios servem como um indicativo da citotoxicidade de diversas substâncias para possíveis aplicações no corpo humano. O ensaio de citotoxicidade da emulsão do branco (nanocelulose fibrilada oxidada e o azeite de oliva extravirgem) mostrou que essa formulação estimula o crescimento celular até 60 $\mu\text{g/mL}$, passando a ter efeito citotóxico em concentrações superiores (Figura 63). Dada a elevada pureza da celulose bacteriana (Lin et al. 2016), espera-se que o estímulo ao aumento da viabilidade celular seja essencialmente devido ação dos constituintes do azeite de oliva, conforme relata Di Nunzio *et al* (2018).

Figura 63- Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado.



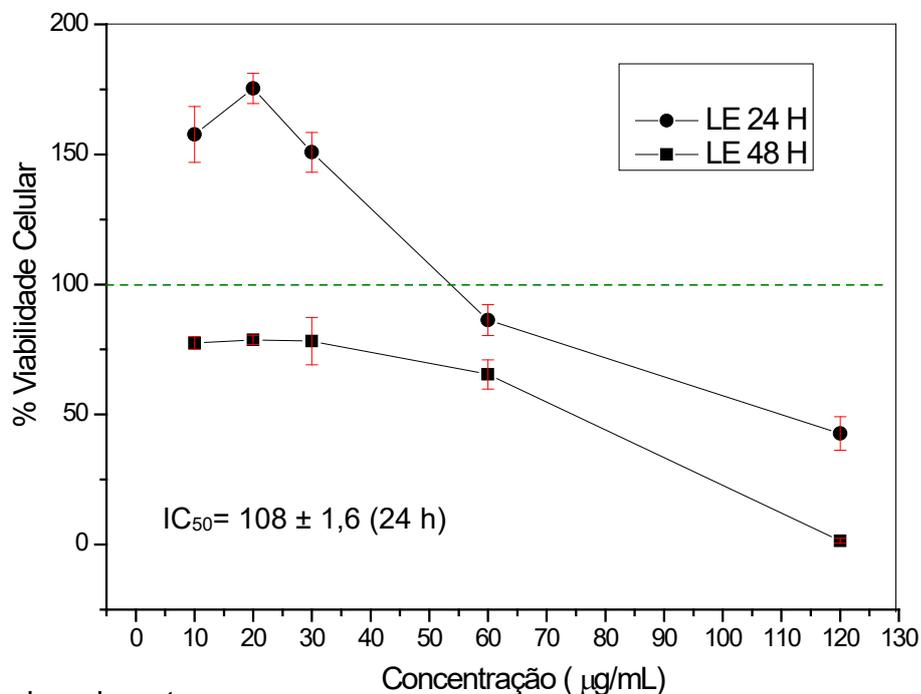
Fonte: elaborada pelo autor

Conforme observado nos gráficos de células viáveis ou metabolicamente ativas até a concentração de 60 µg/mL, todas as amostras apresentam elevada porcentagem de células viáveis ou seja acima de 80% das células permaneceram vivas, sugerindo o caráter não citotóxico das amostras até a concentração mencionada (a linha pontilhada verde corresponde ao controle positivo referente ao meio DMEM suplementado) (Figuras 64,65,66 e 67). Para concentrações inferiores nota-se um estímulo ao crescimento celular com um aumento substancial na porcentagem de células vivas. O destaque principal nessa região do gráfico fica para a concentração de 20 µg/mL que com exceção da amostra PE-10 apresentou uma porcentagem de células viáveis aproximada de 180% para 24 horas de ensaio (Tabela 20). Para essa concentração o crescimento celular é ainda mais favorecido pela adição das amostras LE, LAE e PAE-20, ou seja, a emulsão não serve apenas como meio de dispersão (Figuras 64,65,66 e 67). Os valores reduzidos para resultados após 48h de ensaios podem ser atribuídos a redução significativa do meio DMEM suplementado para esse intervalo de tempo.

Para fins de comparação foi calculada concentração capaz de reduzir em 50 % a porcentagem de células viáveis (IC_{50}). A amostra PAE-20 apresentou o menor valor logo é a que possui maior citotoxicidade, embora esses valores estejam em uma faixa muito segura para inúmeras aplicações.

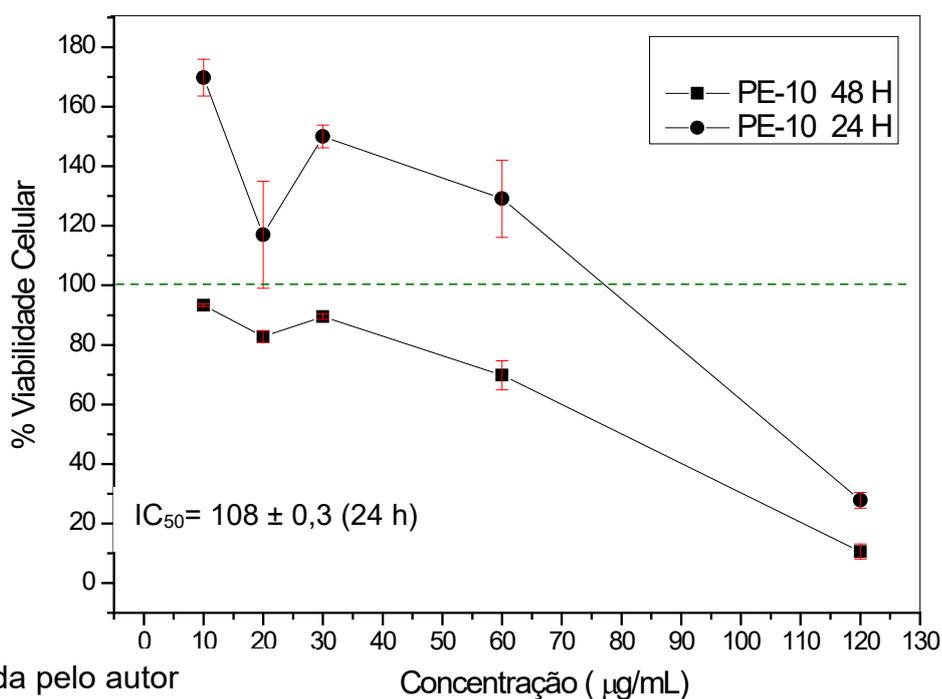
Segundo relata Ugartondo, Mitjans, Vinardell (2008), existe uma tendência das ligninas com maior massa molecular possuírem menor citotoxicidade. Além disso quanto maior atividade antioxidante e menor o valor de Mn, maior a citotoxicidade possivelmente devido a interferências no metabolismo celular (CASTRO, 2017). Conforme no observado no (IC_{50}) das amostras.

Figura 64 - Ensaio de citotoxicidade da emulsão LE para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado.



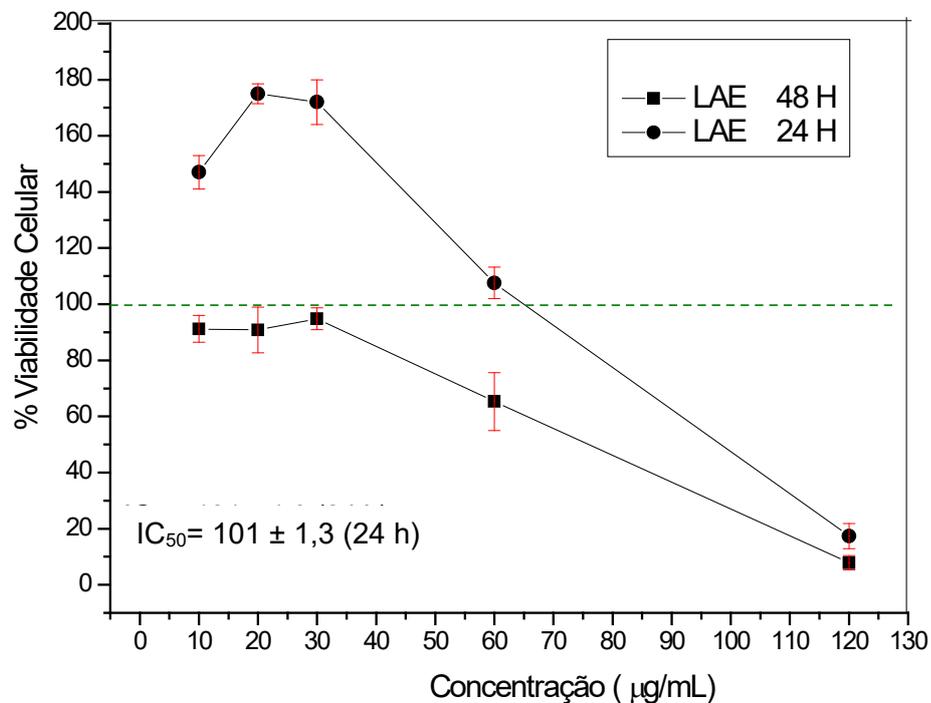
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 65 - Ensaio de citotoxicidade da emulsão PE-10 para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado.



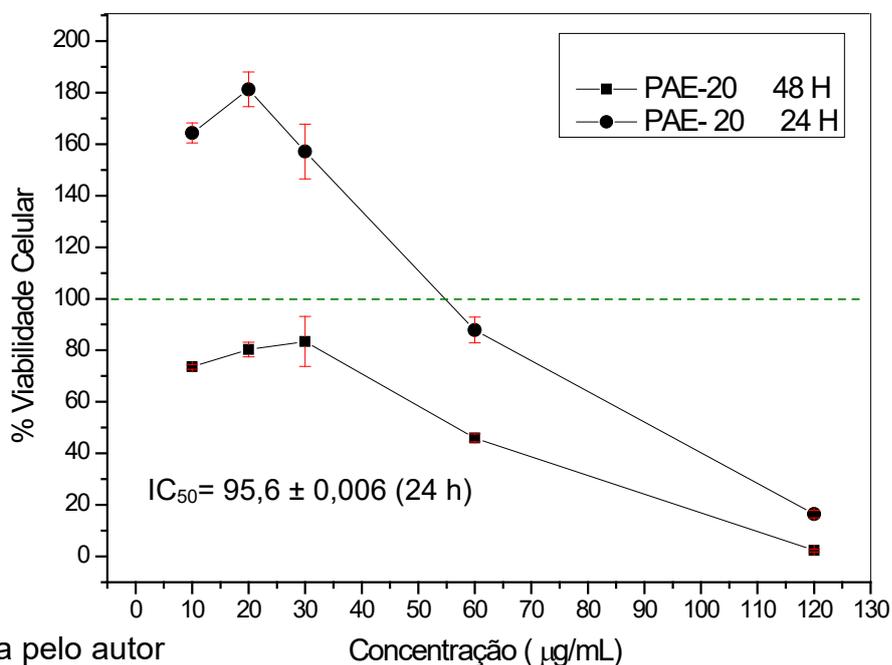
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 66 - Ensaio de citotoxicidade da emulsão LAE para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 67 - Ensaio de citotoxicidade da emulsão PAE-20 para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado.



Fonte: elaborada pelo autor

O ensaio de citotoxicidade para o antioxidante comercial BHT apresenta uma alta porcentagem de células viáveis até 60 µg/mL (Figura 68). A partir dessa concentração começa a ocorrer redução na viabilidade celular, chegando a valores entre 20 a 40% na concentração de 120 µg/mL. Conforme determinado anteriormente (Tabela 16) o IC₅₀ do BHT (concentração necessária para reduzir em 50 % o radical DPPH) é 72,50 ± 2,00 µg/mL. Desse modo se encontra numa faixa de concentrações onde a porcentagem de células viáveis é de apenas 80 %. Já para as amostras obtidas nesse trabalho que possuem um IC₅₀ máximo de 30 µg/mL a porcentagem de células viáveis gira em torno de 150 %, praticamente o dobro da mencionada anteriormente.

Lanigan e Yamarik (2002) citam no relatório final sobre a avaliação de segurança do BHT, que o mesmo demonstrou citotoxicidade *in vitro* em várias linhagens de células de mamíferos. Além disso teve efeitos tóxicos adicionais quando incubados com BHA. Os metabolitos produzidos a partir do BHT foram ainda mais tóxicos, causando inclusive a necrose de tecidos (CASTRO *et al.*, 2017).

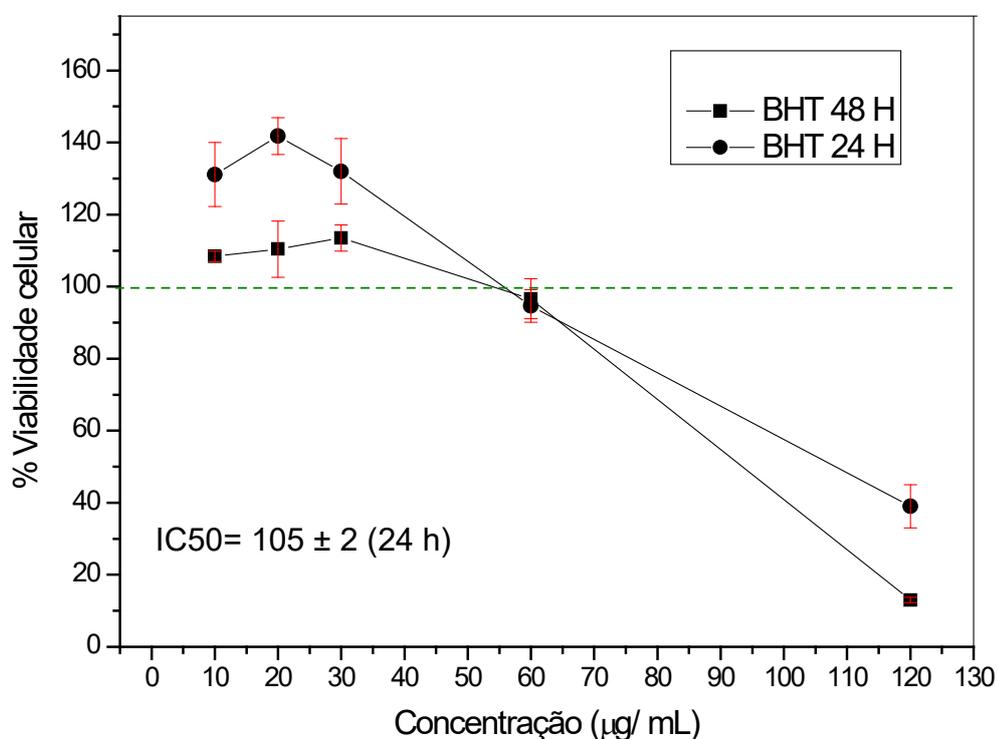
Dentre outros efeitos adversos associados ao BHT, citam-se: solubilização de membranas lisossomais, desorganização da estrutura das mitocôndrias e na cadeia respiratória (FESTJENS *et al.*, 2006), podendo interferir no metabolismo celular (CASTRO, 2017).

Embora seja plenamente aceito que a ingestão de antioxidantes traga efeitos benéficos para o corpo uma vez que combate os radicais livres e conseqüentemente o estresse oxidativo. Esses radicais quando produzidos nas mitocôndrias em quantidades razoáveis, são essenciais para o funcionamento dessas estruturas, podem inclusive combater diversas patologias do corpo. Assim, o estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre as quantidades de radicais livres gerados e antioxidantes presentes no corpo (AVIGNON *et al.*, 2012). Portanto, bons eliminadores de radicais livres devem estar ativos na menor concentração possível, permitindo a ingestão de doses mínimas (CASTRO, 2017).

De acordo com Panico *et al.* (2019), devido ao perfil toxicológico incerto e potencial irritante na pele e mucosa o *Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel* estabeleceu a concentração máxima de 0,5% dos compostos BHA e BHT em cosméticos. Maithili, Anuradha e Nupur (2015), relatam casos em que esses limites

de segurança não foram respeitados, como em produtos de beleza chineses com excesso de chumbo e níquel. Desse modo, há uma crescente conscientização e preferência por cosméticos sem ingredientes tóxicos, especialmente aqueles derivados de petróleo.

Figura 68 - Ensaio de citotoxicidade da emulsão com antioxidante comercial BHT para o intervalo de 24 e 48 horas. Ensaio de citotoxicidade da emulsão branco para o intervalo de 24 e 48 horas. A linha pontilhada verde, corresponde ao controle positivo (100% de células viáveis) referente ao meio DMEM suplementado.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 20- Porcentagem de viabilidade celular das amostras

Concentrações ($\mu\text{g/ mL}$)	% Viabilidade celular (24H)					
	BRANCO	LE	PE-10	LAE	PAE-20	BHT
10	162	157	170	147	163	129
20	126	174	116	174	182	142
30	169	149	150	172	157	131
60	137	87	130	60	89	96
120	30	44	28	17	17	40

Fonte: elaborada pelo autor

7 CONCLUSÕES

Os métodos de extração da lignina demonstraram influência significativa em suas características estruturais e na reatividade durante o processo de alquilação fornecendo diferentes produtos. A lignina extraída teve rendimento acima de 60%. A etapa de auto hidrólise aumentou o teor de hidroxilas fenólicas e carboxilas favorecendo a reatividade. Os processos de auto-hidrólise e alquilação foram responsáveis por um aumento significativo na atividade antioxidante confirmados por diferentes métodos. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante superior ao antioxidante comercial BHT.

As emulsões de Pickering mostraram elevada estabilidade, com ausência de separação de fases, mesmo ao longo de 60 dias de armazenamento. A emulsão do branco apresentou menor estabilidade do que as emulsões com adição das amostras. Esse fato sugere que tanto as amostras e especialmente os produtos alquilados atuam na interface das gotas reduzindo a tensão superficial e aumentando a estabilidade das emulsões.

Os ensaios de citotoxicidade apresentaram elevada porcentagem de células viáveis para todas as amostras até concentração de 60 µg/mL, o que representa mais que o triplo da concentração necessária para os produtos atuarem como antioxidantes. A sinergia das amostras com a emulsão para além de não se mostrar citotóxica as células, ainda serviu como estímulo para o crescimento celular. Já para o BHT (antioxidante comercial largamente utilizado em cosméticos) para as concentrações em que é usado como antioxidante apresentou citotoxicidade. Desse modo, a aplicação da lignina alquilada em emulsões de Pickering é bastante promissora.

REFERÊNCIAS

- AADIL, K. R.; PANDEY, N.; MUSSATTO, S. I.; JHA, H. Green synthesis of silver nanoparticles using acacia lignin, their cytotoxicity, catalytic, metal ion sensing capability and antibacterial activity. **J. Environ. Chem. Eng.**, [Saint Louis], v.7, n.5, p.103296, 2019.
- A PALMA no Brasil e no mundo. **ABRAPALMA**,Pará, 2019. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/a-palma-no-brasil-e-no-mundo/>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- ÓLEO de palma e derivados para a indústria de alimentos. **Food Ingredients Brasil**, Baueri, v. 16, n. 31, p.45-46, 2014.
- AGRAWAL, A.; KAUSHIK, N.; BISWAS, S. Derivatives and applications of lignin—an insight. **Scitech. j.**, v.1, n.7, p.30-36, 2014.
- ALBERT, C.; BELADJINE, M.; TSAPIS, N.; FATTAL, E.; AGNELY, F.; HUANG, N. Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. **J. Control. Release.**, [Saint Louis], v. 309, p. 302-332, 2019.
- AMINZADEH, S., LAUBERTS, M., DOBELE, G., PONOMARENKO, J., MATTSSON, T., LINDSTRÖM, M. E., SEVASTYANOVA, O. Membrane filtration of kraft lignin: Structural characteristics and antioxidant activity of the low-molecular-weight fraction. **Ind. Crop. Prod.**, [Saint Louis], 112, 200-209,2018.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.042>
- ANDRADE, E. A cadeia produtiva da palma de óleo no Estado do Pará: Uma avaliação crítica.: **Audiência Pública sobre o Programa Nacional de Produção Sustentável de Óleo de Palma**, Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-publicas-2015/audiencia-publica-26-de-marco-de-2015-faepa>>. Acesso em: 30 nov. 2017.
- ARSHANITSA, A.; PONOMARENKO, J.; DIZHBITE, T.; ANDERSONE, A.; GOSSELINK, R. J.; VAN DER PUTTEN, J.; TELYSHEVA, G. Fractionation of technical lignins as a tool for improvement of their antioxidant properties. **J. Anal. Appl. Pyrol.**, [Saint Louis], v.103, p.78-85, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.12.023>
- AVIGNON, A.; HOKAYEM, M.; BISBAL, C.; LAMBERT, K. Dietary antioxidants: do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism? **Nutrition**, [Saint Louis], v. 28, n. 7-8, p. 715-721, 2012.
- BABU, B.; WU, J. T. Production of natural butylated hydroxytoluene as an antioxidant by freshwater phytoplankton. **J. Phycol.**, [S.I.]. v. 44, n. 6, p. 1447-1454, 2008.
- BAJWA, D. S.; POURHASHEM, G.; ULLAH, A. H.; BAJWA, S. G. A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact. **Ind. Crop. Prod.**, [Saint Louis], v.139, p.111526, 2019.

BAJWA, D. S.; POURHASHEM, G.; ULLAH, A. H.; BAJWA, S. G. **Introduction to cosmetic formulation and technology**. New Jersey. John Wiley & Sons, 2015.

BENAR, Priscila. **Polpação acetosolv de bagaço de cana e madeira de eucalipto**. 1992. [79]f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/249490>>. Acesso em: 13 jul. 2018.

BENHAMOU, K.; DUFRESNE, A.; MAGNIN, A.; MORTHA, G.; KADDAMI, H. Control of size and viscoelastic properties of nanofibrillated cellulose from palm tree by varying the TEMPO-mediated oxidation time. **Carbohydr. Polym.**, [Saint Louis], v.99, p.74-83, 2014.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, [Saint Louis], v.239, n.1, p70-76, 1996.

BERTOLO, M. R.; DE PAIVA; L. B. B., NASCIMENTO; V. M., GANDIN; C. A., NETO; M. O., DRIEMEIER; C. E., RABELO, S. C. Lignins from sugarcane bagasse: Renewable source of nanoparticles as Pickering emulsions stabilizers for bioactive compounds encapsulation. **Ind. Crop. Prod.**, [Saint Louis], v.140, p.111591, 2019.

BRANDÃO, F.; SCHONEVELD, G.; PACHECO, P. Integração da agricultura familiar à cadeia da palma de óleo na Amazônia Brasileira: análise e recomendações, p-6, 207, **CIFOR**, Indonésia, 2018.

BRAS, J.; HASSAN, M. L.; BRUZESSE, C.; HASSAN, E. A.; EL-WAKIL, N. A., DUFRESNE, A. Mechanical, barrier, and biodegradability properties of bagasse cellulose whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. **Ind. Crop. Prod.**, [Saint Louis], v.32, n.3, p. 627-633, 2010.

BRESSANINI, Dario. Per fare un olio ci vuole un seme (o un frutto). Gli oli spiegati bene. 2016. Disponível em: <http://bressaninilescienze.blogautore.espresso.repubblica.it/2016/11/14/per-fare-un-olio-civuole-un-seme-o-un-frutto-gli-oli-spiegati-bene-2/comment-page2/?refresh_ce>. Acesso em: 14 nov. 2016.

BOVA, T.; TRAN, C. D.; BALAKSHIN, M. Y.; CHEN, J.; CAPANEMA, E. A.; NASKAR, A. K. An approach towards tailoring interfacial structures and properties of multiphase renewable thermoplastics from lignin–nitrile rubber. **Green Chem.**, London, v. 18, n. 20, p. 5423-5437, 2016.

CASTRO, L. D. S.; BRACHT, L.; COMAR, J. F.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A. A reappraisal of the proposed metabolic and antioxidant actions of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver. **J. BIOCHEM. MOL. TOXIC.** [S.l.]. v.31, n.8, p.21924, 2017.

CASTRO, Lorena dos Santos. **Contribuições para o conhecimento dos efeitos do BHT e outros antioxidantes no fígado**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência

de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

CAMPIONI, T. S.; SOCCOL, C. R.; LIBARDI JUNIOR, N.; RODRIGUES, C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; LETTI, L. A. J.; VANDENBERGHE, L. P. D. S. Sequential chemical and enzymatic pretreatment of palm empty fruit bunches for *Candida pelliculosa* bioethanol production. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, Russia, p.1-9, 2019.

CAO, C.; LIN, Y. Correlation between the glass transition temperatures and repeating unit structure for high molecular weight polymers. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, Washington, v.43, n.2, 643-650, 2003.

CAREY, Francis A.; GIULIANO, Robert M. **Organic Chemistry**. 10. ed. New York: Mcgraw-hill, 2016.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **J. Sci. Ind. Res.**, India, v. 67, n.11, pp. 849-864, 2008.

CARVAJAL, J. C.; GÓMEZ, Á.; CARDONA, C. A. Comparison of lignin extraction processes: Economic and environmental assessment. **Bioresour. Technol.**, [Saint Louis], v.214, p.468-476, 2016.

CASAS, A.; ALONSO, M. V.; OLIET, M.; ROJO, E.; RODRÍGUEZ, F. FTIR analysis of lignin regenerated from *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus* woods dissolved in imidazolium-based ionic liquids. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** [S.I.]. v. 87, n. 4, p. 472-480, 2012.

ÇELIK, S. E.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. **Talanta**, [Saint Louis], v.81, n.4-5, 1300-1309, 2010.

CHEN, K.; QIAN, Y.; WU, S.; QIU, X.; YANG, D.; LEI, L. Neutral fabrication of UV-blocking and antioxidation lignin-stabilized high internal phase emulsion encapsulates for high efficient antibacterium of natural curcumin. **Food Funct.**, [London], v. 10, n. 6, p. 3543-3555, 2019.

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M. A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, [Saint Louis], v.439, p.23-34, 2013.

CHIANG, P.; PAN, S. Paper Industry, Construction, and Mining Process Wastes. In: CHIANG, P.; PAN, S. **Carbon Dioxide Mineralization and Utilization**. Singapore, Springer, 2017. p. 265-274.

COLLARD, F.; BLIN, J. A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, [Saint Louis], v. 38, p. 594-608, 2014.

COLLINS, M. N.; NECHIFOR, M.; TANASA, F.; ZANOAGA, M.; MCLOUGHLIN, A.; STRÓZYK, M. A., TEACA, C. A. Valorization of lignin in polymer and composite systems for advanced engineering applications—a review. **Int. J. Biol. Macromol.**, [Saint Louis], v. 131, p. 828-849, 2019.

COTINGUIBA, G.; SILVA, J.; AZEVEDO, R. Methods of the antioxidant defense: a literature review. **Unopar cient ciênc biol saúde**, Londrina, v.15, p.3, 231-237, 2013.

DAI, L.; LI, Y.; KONG, F.; LIU, K.; SI, C.; NI, Y. Lignin-based Nanoparticles Stabilized Pickering Emulsion for Stability Improvement and Thermal-Controlled Release of trans-Resveratrol. **ACS Sustainable Chem. Eng**, [Washington], v. 7, p. 13497-13504, 2019.

DING, R.; WU, H.; THUNGA, M.; BOWLER, N.; KESSLER, M. R. Processing and characterization of low-cost electrospun carbon fibers from organosolv lignin/polyacrylonitrile blends. **Carbon**, [Saint Louis], v.100, p.126-136, 2016.

DI NUNZIO, M.; PICONE, G.; PASINI, F.; CABONI, M. F.; GIANOTTI, A.; BORDONI, A.; CAPOZZI, F. Olive oil industry by-products. Effects of a polyphenol-rich extract on the metabolome and response to inflammation in cultured intestinal cell. **Int. Food Res.**, [Saint Louis], v.113, p.392-400, 2018.

DIZHBITE, T. Characterization of the radical scavenging activity of lignins—natural antioxidants. **Bioresour. Technol.**, [Saint Louis], v. 95, p. 309-317, 2004.

EL HAGE, R.; CHRUSCIEL, L.; DESHARNAIS, L.; BROSSE, N. Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignin structure and organosolv delignification. **Bioresour. Technol.**, [Saint Louis], v. 101, p. 9321-9329, 2010.

EL MANSOUR, N. E.; YUAN, Q.; HUANG, F. Study of chemical modification of alkaline lignin by the glyoxalation reaction. *BioResources*, [Raleigh], v. 6, p. 4523-4536, 2011.

ESPINOZA-ACOSTA JL, TORRES-CHAVEZ PI, RAMIREZ-WONG B, LOLEZ-SAIZ CM., MONTANK-LEYVA B. Antioxidant, Antimicrobial, and Antimutagenic Properties of Technical Lignins and Their Applications, **BioResources**, [Raleigh], v.11, p.5452-5481, 2016.

FANG, T. W., ASYIKIN, N., SYASYA, N. S., SHAWKATALY, A. K. H., KASSIM, M. H. M., SYAKIR, M. I. Water Absorption and Thickness Swelling of Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) and Seaweed Composite for Soil Erosion Mitigation. **Int. J. Phys. Sci.**, [Lagos], v. 28, p. 1-17, 2017.

FERNÁNDEZ-COSTAS, C.; GOUVEIA, S.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Structural characterization of Kraft lignins from different spent cooking liquors by 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Biomass Bioenergy*, [Saint Louis], v.63, p.156-166, 2014.

FESTJENS, N.; KALAI, M.; SMET, J.; MEEUS, A.; VAN COSTER, R.; SAELENS, X.; VANDENABEELE, P. Butylated hydroxyanisole is more than a reactive oxygen species scavenger. **Cell Death Differ.**, [Jersey City], v.13, p.166-169, 2006.

FERRER, A.; VEGA, A.; RODRÍGUEZ, A., JIMÉNEZ, L. Acetosolv pulping for the fractionation of empty fruit bunches from palm oil industry. **Bioresour. Technol.**, [Saint Louis], v. 132, p. 115-120, 2013.

FERNANDES, C. D. N.; PINTO, I. C. M. D. S.; SARAIVA, R. L. D. P.; ARAÚJO JÚNIOR, C. P. D.; CABRAL, A. E. B.; ROSA, M. D. F. Particles panels prepared from dendê mesocarp as an alternative to MDF used in civil construction. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro, 2019.

FRANZOL, A.; REZENDE, M.C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, São Carlos, v.25, p.1-9, 2015.

GELLERSTEDT, G. Softwood kraft lignin: Raw material for the future. **Ind Crops Prod**, [Saint Louis], v. 77, p. 845-854, 2015.

GIADA, M.D.L.R. Uma abordagem sobre a capacidade antioxidante in vitro de alimentos vegetais e bebidas. **Demetra**, Rio de Janeiro, v.9, p.137-146, 2014.

GOLDMANN, W. M.; AHOLA, J.; MANKINEN, O.; KANTOLA, A. M.; KOMULAINEN, S.; TELKKI, V. V.; TANSKANEN, J. Determination of Phenolic Hydroxyl Groups in Technical Lignins by Ionization Difference Ultraviolet Spectrophotometry ($\Delta\varepsilon$ -IDUSmethod). **Period.Polytech.Chem.**, [Budapest], v. 61, p.93-101, 2017.

GONG, W.; XIANG, Z.; YE, F.; ZHAO, G. Composition and structure of an antioxidant acetic acid lignin isolated from shoot shell of bamboo (*Dendrocalamus Latiforus*). **Ind Crops Prod**, [Saint Louis], v. 91, p. 340-349, 2016.

GOSELINK, R. J. A.; ABÄCHERLI, A.; SEMKE, H.; MALHERBE, R.; KÄUPER, P.; NADIF, A.; VAN DAM, J. E. G. Analytical protocols for characterisation of sulphur-free lignin. **Ind Crops Prod**, [Saint Louis], v. 19, p. 271-281, 2004.

GRECO, L.; ULLO, S.; RIGANO, L.; FONTANA, M.; BERARDESCA, E. Evaluation of the Soothing and Protective Properties of a Lignin Hydrolyzate. **Cosmetics**, [Basel] v.6, p.38, 2019.

HAFIS, S. M.; RIDZUAN, M. J. M.; MOHAMED, A. R.; FARAHANA, R. N.; FATIN, B. N.; SYAHRULLAIL, S. Properties of Palm Pressed Fibre for Metal Forming Lubricant Applications. **Procedia Eng.**, [Saint Louis], v. 68, p. 130-137, 2013.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in Biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543 p.

HASSAN, M. A.; AHMAD FARID, M. A.; SHIRAI, Y.; ARIFFIN, H.; OTHMAN, M. R.; SAMSUDIN, M. H.; HASAN, M. Y. Oil palm biomass biorefinery for sustainable production of renewable materials. **Biotechnol. J.**, [Augusta], v.14, p.1-8, 2019.

Hatakeyama, H.; Hatakeyama, T. Lignin structure, properties, and applications. In Hatakeyama, H.; Hatakeyama, T. **Biopolymers**. Berlin, Springer, 2017, p.1-63.

EMULSÕES Pickering com poder Ultrasonics. **Hielscher**, Alemanha, 2019
Disponível em: <<https://www.hielscher.com/pt/pickering-emulsions-with-power-ultrasonics.htm>>. Acesso em: 14 dez. 2019.

HUSSIN, M. H.; RAHIM, A. A.; IBRAHIM, M. N. M.; YEMLOUL, M.; PERRIN, D.; BROSSE, N. Investigation on the structure and antioxidant properties of modified lignin obtained by different combinative processes of oil palm fronds (OPF) biomass. **Ind Crops Prod**, [Saint Louis], v. 52, p. 544-551, 2014.

HUSSIN, M. H.; RAHIM, A. A.; IBRAHIM, M. N. M.; BROSSE, N. Physicochemical characterization of alkaline and ethanol organosolv lignins from oil palm (*Elaeis guineensis*) fronds as phenol substitutes for green material applications. **Ind Crops Prod**, [Saint Louis], v. 49, p. 23-32, 2013.

IBGE. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Brasília, ANVISA, 2005. 1018 p.

IRAVANI, S; VARMA, R., S. Greener synthesis of lignin nanoparticles and their applications. **Green Chem.**, [London], v. 22, p. 612-636, 2020.

JARDINE, J. G.; BARROS, T. D. **Dendê. AGEITEC**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5eo0sawqe3valo63n.html>>. Acesso em: 09 set. 2017.

JABLONSKÝ, M.; KOČIŠ, J.; HÁZ, A.; ŠIMA, J. Characterization and comparison by UV spectroscopy of precipitated lignins and commercial lignosulfonates. **Cell. Chem. Technol.** [S.I.]. v. 49, p. 267-274, 2015.

KAI, D.; TAN, M. J.; CHEE, P. L.; CHUA, Y. K.; YAP, Y. L.; LOH, X. J. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. **Green Chem.**, [London], v. 18, p 1175-1200, 2016.

KALASHNIKOVA, I.; BIZOT, H.; CATHALA, B.; CAPRON, I. New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. **Langmuir**, [Washington], v.27, p. 7471-7479, 2011.

KALASHNIKOVA, I.; BIZOT, H.; BERTONCINI, P.; CATHALA, B.; CAPRON, I. "Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions." **Soft Matter**, [London], v.9, p. 952-959, 2013.

KASIVISVANATHAN, H.; NG, R. T.; TAY, D. H.; NG, D. K. Fuzzy optimisation for retrofitting a palm oil mill into a sustainable palm oil-based integrated biorefinery. **Chem. Eng. J.**, [Saint Louis], v. 200, p. 694-709, 2012.

KHAN, I. T.; NADEEM, M.; IMRAN, M.; ULLAH, R.; AJMAL, M.; JASPAL, M. H. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. **Lipids Health Dis.** [S.I.]. v.18, p.41, 2019.

KIM, J. Y.; JOHNSTON, P. A.; LEE, J. H.; SMITH, R. G.; BROWN, R. C. Improving lignin homogeneity and functionality via ethanolysis for production of antioxidants. **ACS Sustain Chem Eng**, [Washington], v.7, p.3520-3526, 2019.

KOŠÍKOVÁ, B.; GREGOROVA, A.; OSVALD, A.; KRAJČOVIČOVÁ, J. Role of lignin filler in stabilization of natural rubber-based composites. **J. Appl. Polym.**, [Augusta], v. 103, p. 1226-1231, 2007.

KUSUMAWATI, I., INDRAYANTO, G. Natural antioxidants in cosmetics. In Kusumawati, I., Indrayanto, G. **Studies in natural products chemistry**, Elsevier, [Saint Louis], 2013. p. 485-505.

LAM, M. K.; JAMALLUDDIN, N. A.; LEE, K. T. Production of biodiesel using palm oil. In *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*. **Academic Press**, [Saint Louis], p. 539-574, 2019.

LANIGAN, R. S.; YAMARIK, T. A. Final report on the safety assessment of BHT (1). *Int. J. Toxicol.*, [Bethesda], v.21, p.19-94, 2002.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Prog. Polym. Sci.**, [Saint Louis], v.39, p.1266-1290, 2014.

LI, H.; MCDONALD, A. G. Fractionation and characterization of industrial lignins. **Ind Crops Prod**, [Saint Louis], v. 62, p. 67-76, 2014.

LI, M. F.; SUN, S. N.; XU, F.; SUN, R. C. Microwave-assisted organic acid extraction of lignin from bamboo: Structure and antioxidant activity investigation. **Food Chem**, [Saint Louis], v. 134, p. 1392-1398, 2012.

LI, X.; WANG, Y.; WANG, B.; FENG, X.; MAO, Z.; SUI, X. Antibacterial phase change microcapsules obtained with lignin as the Pickering stabilizer and the reducing agent for silver. **Int. J. Biol. Macromol.**, [Saint Louis], v.144, p.624-631, 2020.

LIN, S. P.; CALVAR, I. L.; CATCHMARK, J. M.; LIU, J. R.; DEMIRCI, A.; CHENG, K. C. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, [Berlin], v.20, p. 2191-2219, 2013.

LIU, D.; SHENG, J.; LI, Z.; QI, H.; SUN, Y.; DUAN, Y.; ZHANG, W. Antioxidant activity of polysaccharide fractions extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. **Int. J. Biol. Macromol.**, [Saint Louis], v. 56, p. 1-5, 2013.

LU, Q.; LIU, W.; YANG, L.; ZU, Y.; ZU, B.; ZHU, M.; HUANG, J. Investigation of the effects of different organosolv pulping methods on antioxidant capacity and extraction efficiency of lignin. **Food Chem**, [Saint Louis], v. 131, p. 313-317, 2012.

LU, F.; RALPH, J. **Lignin: Structural Analysis, Applications in Biomaterials, and Ecological Significance**. Nova Science Publishers, [Hauppauge], 2014.

LORA, J. H.; GLASSER, W. G. Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. **J Polym Environ**, [S.I.]. v. 10, p. 39-48, 2002.

MACFARLANE, A. L.; FARID, M. M.; CHEN, J. J. J. Kinetics of delignification using a batch reactor with recycle. **Chem. Eng. Process.**, [Saint Louis], v. 48, p. 864-870, 2009.

MAITHILI, A.; ANURADHA, S.; NUPUR, M. Toxic effects of cosmetics on the users: a review. **J Environ Res Dev**, [Bophal], v.9, p.900-905, 2015.

MANCINI, A.; IMPERLINI, E.; NIGRO, E.; MONTAGNESE, C.; DANIELE, A.; ORRÙ, S.; BUONO, P. Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health. **Molecules**, [Bethesda], v.20, p.17339-17361, 2015.

MAPA (Ed.). **Diagnóstico da Produção Sustentável da Palma de Óleo no Brasil.**, Brasília, 2018. Disponível em: <https://aprobio.com.br/novosite/wp-content/uploads/2018/08/Diagn%C3%B3stico-Prod-Sust-da-Palma-de-%C3%93leo_MAPA_2018.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2020.

MATSUURA, T.; OHKATSU, Y. Phenolic antioxidants: Effect of o-substituents having none-conjugated double bond. **Am. Chem. Soc. Div. Pet. Chem. Prepr.**, [S.I.]. v. 44, p. 309-311, 1999.

MAREČEK, V.; MIKYŠKA, A.; HAMPEL, D.; ČEJKA, P.; NEUWIRTHOVÁ, J.; MALACHOVÁ, A.; CERKAL, R. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. **J. Cereal Sci.**, [Saint Louis], v.73, p.40-45, 2017.

MCDONOUGH, T. J. **The chemistry of organosolv delignification.**, Atlanta, Institute of Paper Science and Technology, 1992.

MENG, Q. B.; WEBER, J. Lignin-based Microporous Materials as Selective Adsorbents for Carbon Dioxide Separation. **Chem Sus Chem**, [Augusta], v.7, p.3312-3318, 2014.

MESELHY, K. M.; SHAMS, M. M.; SHERIF, N. H.; EL-SONBATY, S. M. Phytochemical study, potential cytotoxic and antioxidant activities of selected food byproducts (Pomegranate peel, Rice bran, Rice straw & Mulberry bark). **Nat prod res**, [London], v.34, p.530-533, 2020.

MISHRA, K., OJHA, H., CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chem**, [Saint Louis], v.130, n.4, 1036-1043, 2012.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. (Ed.). **Natural fibers, biopolymers, and biocomposites.** CRC press, [Boca Ratón], 2005.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M.F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica.** Campina Grande, 2010. 56 f. Documentos. Embrapa Algodão. Campina Grande. 2010.

MORGANTI P, STOLLER M. Chitin And Lignin: Natural Ingredients From Waste Materials To Make Innovative And Healthy Products For Humans And Plant. press in: **Chem Eng Trans**, [Milano], 60, 2017.

- MOURE, A.; GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H. Effect of Hydrothermal Pretreatment on Lignin and Antioxidant Activity. In: MOURE, A.; GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H. **Hydrothermal Processing in Biorefineries**. Springer, Manhattan, 2017. p. 5-43.
- NAKAGAME, S.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.**, [Augusta], v. 105, p. 871-879, 2010.
- NENADIS, N.; WANG, L.F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H.Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. **J. Agric. Food Chem.**, [Washington], v.52, p- 4669-4674., 2004.
- NOGUEIRA, M., I.; AVELINO, F.; DE OLIVEIRA, D. R.; SOUZA, N. F.; ROSA, M. F.; MAZZETTO, S. E. LOMONACO, D. Organic solvent fractionation of acetosolv palm oil lignin: The role of its structure on the antioxidant activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, [Saint Louis], v.122, p.1163-1172, 2018.
- NORDIN, N. A.; SULAIMAN, O.; HASHIM, R.; KASSIM, M. H. M. Oil Palm Frond Waste for the Production of Cellulose Nanocrystals. **J. Phys. Sci.**, [S.I.]. p. 115-126, 2017.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, [São Paulo], v. 33, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, F.C. **Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado**, 2015, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). **World Population Prospects 2019: Highlights**. ST/ESA/SER.A/423. Disponível em <https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf > Acesso em: 02. Jan. 2020.
- ÖZYÜREK, M.; BEKTAŞOĞLU, B.; GÜÇLÜ, K.; GÜNGÖR, N.; APAK, R. Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone–water solution containing 2% methyl-β-cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. **Anal. Chim. Acta**, [Saint Louis], v.630, p.28-39, 2008.
- PAES, J. B., MEDEIROS NETO, P. N. D., LIMA, C. R. D., FREITAS, M. D. F. D., DINIZ, C. E. F. Efeitos dos extrativos e cinzas na resistência natural de quatro madeiras a cupins xilófagos. **Cerne**, Lavras, v.19, p.399-405, 2013.
- PANICO, A.; SERIO, F.; BAGORDO, F.; GRASSI, T.; IDOLO, A.; DE GIORGI, M.; DE DONNO, A. Skin safety and health prevention: an overview of chemicals in cosmetic products. **JPMH**, [Bethesda], v.60, p.E50, 2019.
- PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A. Powering the Activity of Natural Phenol Compounds by Bioinspired Chemical Manipulation. In: PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A. **Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health**, Washington, 2018, p. 407-426.

PANZELLA, L., NAPOLITANO, A. Natural Phenol Polymers: Recent Advances in Food and Health Applications. **Antioxidants**, Suíça, v. 6, p. 30, 2017.

PAXIMADA, P.; TSOUKO, E.; KOPSAHELIS, N.; KOUTINAS, A. A.; MANDALA, I. Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. **Food Hydrocoll.**, [Saint Louis], v.53, p.225-232, 2016.

PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Cienc. Rural**, [Santa Maria] p.155-162, 2015.

PICHOT, R.; SPYROPOULOS, F.; NORTON, I. T. Competitive adsorption of surfactants and hydrophilic silica particles at the oil–water interface: Interfacial tension and contact angle studies. **J colloid interf sci**, [Saint Louis], v.377, p. 396-405, 2012.

QIAN, Y.; QIU, X.; ZHU, S. Lignin: a nature-inspired sun blocker for broad-spectrum sunscreens. **Green Chem.**, [London], v.17, p.320-324, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med**, [Saint Louis], v.26, p.1231-1237, 1999.

RENCORET, J.; RALPH, J.; MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, A. T.; DEL RÍO, J. C. Structural characterization of lignin isolated from coconut (*Cocos nucifera*) coir fibers. **J. Agric. Food Chem**, [Washington], v. 61, p. 2434-2445, 2013.

RODRIGUES, D. D. S., GAMBETTA, R. (2017). Processo Organosolv para fracionamento de biomassa lignocelulósica. **Embrapa Agroenergia- Documentos**. Disponível em < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085326/processo-organosolv-para-fracionamento-de-biomassa-lignocelulosica> > Acesso em: 02. jan. 2020

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico** (INFOTECA-E), Fortaleza, 2007.

RUFINO, M. D. S. M.; Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Oliveira, M. S., Saura-Calixto, F. Açaí (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Res. Int.**, [Saint Louis], v.44, p.2100-2106, 2011.

SAITO, T., KIMURA, S., NISHIYAMA, Y., ISOGAI, A. Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. **Biomacromolecules**, [Washington] v. 8, p. 2485–2491, 2007.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Á., MARTÍN-MARTÍNEZ, F. J., DOBADO, J. A. The role of weak interactions in lignin polymerization. Journal of molecular modeling, **J. Mol. Model.**, [Bethesda], v. 23, p. 80, 2017.

SANTOS, L.C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothix* (Eriocaulaceae). **Rev. Bras. Farmacogn**, [Araraquara], v. 13, p. 67-74, 2003.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X., XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **J. Funct. Foods**, [Saint Louis], v.18, p.782-796, 2015.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **J. Funct. Foods**, [Saint Louis], v. 18, p. 820-897, 2015.

SOUZA, N. F.; PINHEIRO, J. A.; SANTA BRÍGIDA, A. I.; MORAIS, J. P. S.; DE FREITAS ROSA, M. Fibrous residues of palm oil as a source of green chemical building blocks. **Ind Crops Prod**, [Saint Louis], v. 94, p. 480-489, 2016.

SUBEDI, D. P. Contact angle measurement for the surface characterization of solids. **Himalayan Physics**, [Dulikhel], v.2, p.1-4, 2011.

TAN, Y.; XU, K.; LIU, C.; LI, Y.; LU, C.; WANG, P. Fabrication of starch-based nanospheres to stabilize pickering emulsion. **Carbohydr. Polym.**, [Saint Louis], v.88, p.1358-1363, 2012.

TONOLI, G. H. D.; TEIXEIRA, E. M.; CORRÊA, A. C.; MARCONCINI, J. M.; CAIXETA, L. A.; PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; MATTOSO, L. H. C. Cellulose micro/nanofibres from *Eucalyptus* kraft pulp: preparation and properties. **Carbohydr. Polym.**, [Saint Louis], v.89, p. 80-88, 2012.

TRCHOVÁ, M., ŠEDĚNKOVÁ, I., TOBOLKOVÁ, E., STEJSKAL, J. FTIR spectroscopic and conductivity study of the thermal degradation of polyaniline films. **Polym Degrad Stabil**, [Saint Louis], v. 86, p. 179-185, 2004.

UGARTONDO V; MITJANS M; VINARDELL MP. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. **Bioresour. Technol.**, [Saint Louis], v. 99, p. 6683-6687, 2008.

USDA. 2018. Oilseeds: World Markets and trade. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Office of Global Analysis. World Agricultural Outlook Board, USDA. Disponível em < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf> > Acessado em 20/11/2019

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiol.**, [Bethesda], v. 153, p. 895-905, 2010.

VASCONCELOS, N. F.; FEITOSA, J. P. A.; DA GAMA, F. M. P.; MORAIS, J. P. S.; ANDRADE, F. K.; DE SOUZA, M. D. S. M.; DE FREITAS ROSA, M. Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: properties and morphological features. **Carbohydr. Polym.**, [Saint Louis], v.155, p.425-431, 2017.

VINARDELL, M. P.; UGARTONDO, V.; MITJANS, M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. **Ind Crops Prod**, [Saint Louis], v. 27, p. 220-223, 2008.

WEI, Y. S.; NIU, Z. C.; WANG, F. Q.; FENG, K.; ZONG, M. H.; WU, H. A novel Pickering emulsion system as the carrier of tocopheryl acetate for its application in cosmetics. **Mater. Sci. Eng. C**, [Saint Louis], v.109, p.110503, 2020.

YAN, H.; CHEN, X.; SONG, H.; LI, J.; FENG, Y.; SHI, Z.; LIN, Q. Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocoll.*, [Saint Louis], v.72, p.127-135, 2017.

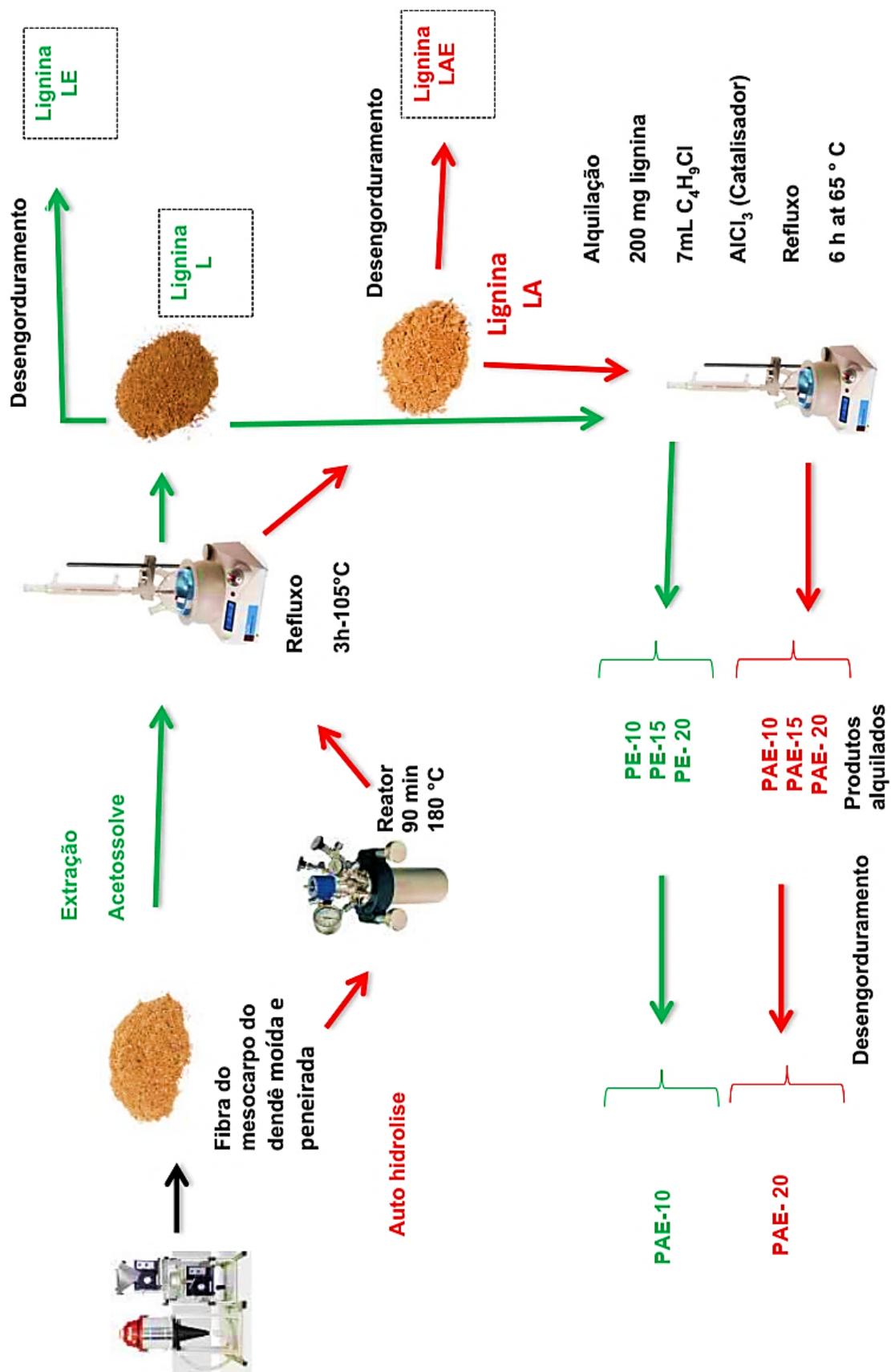
ZHANG, J.; LIN, X.; LUO, X.; ZHANG, C.; ZHU, H. A modified lignin adsorbent for the removal of 2, 4, 6-trinitrotoluene. **Chem. Eng. J.**, [Saint Louis], v. 168, p. 1055-1063, 2011.

ZHOU, Y.; ZHANG, J.; LUO, X.; LIN, X. Adsorption of Hg (II) in aqueous solutions using mercapto-functionalized alkali lignin. **J. Appl. Polym. Sci.**, [Augusta], v.131, 2014.

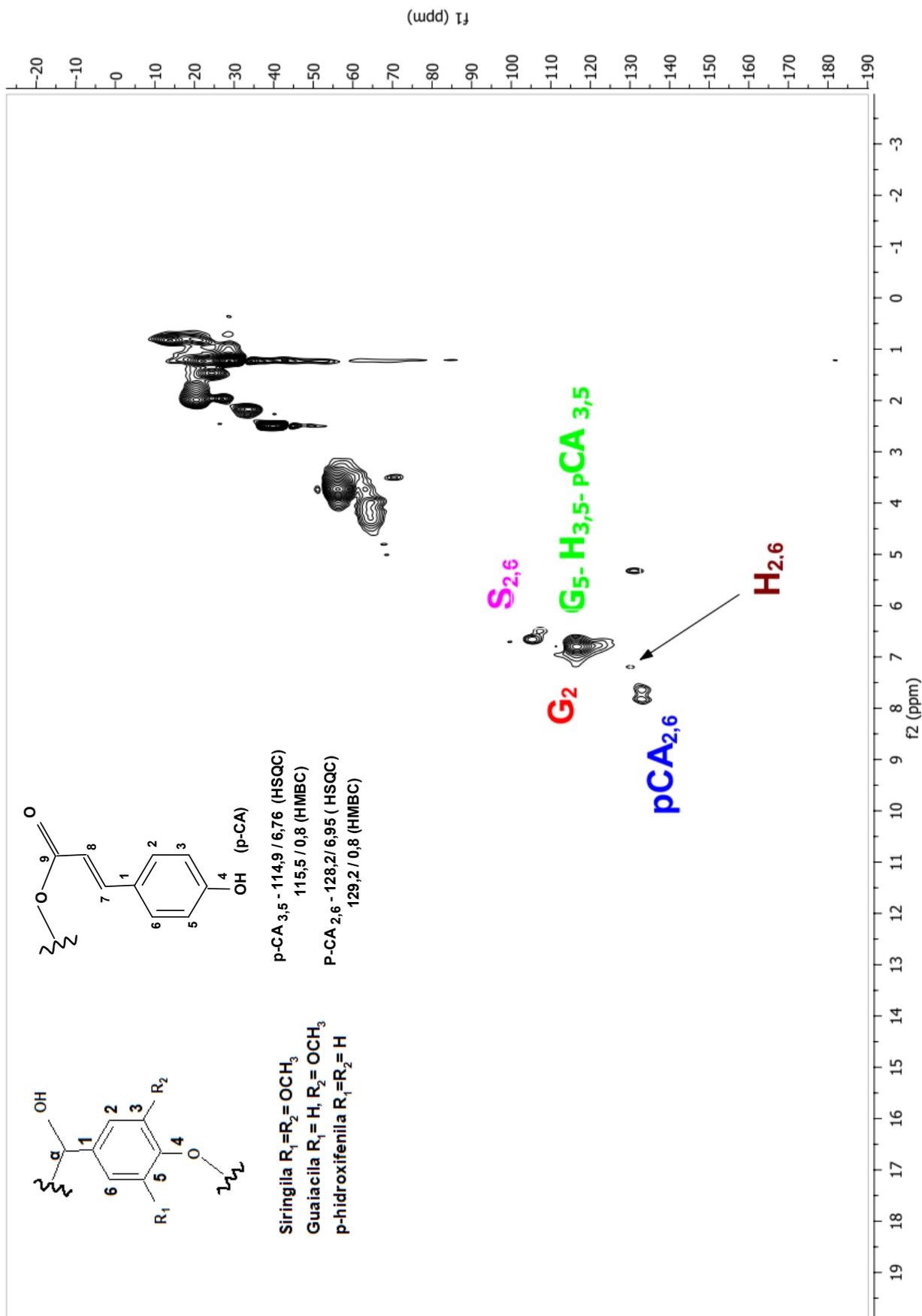
ZHU, D.; QIN, C.; AO, S.; WANG, M.; WU, M.; LÜ, Y.; YE, P. Hypercrosslinked functionalized lignosulfonates prepared via Friedel–Crafts alkylation reaction for enhancing Pb (II) removal from aqueous. **Sep. Sci. Technol.**, v.54, [London], p.2830-2839, 2019.

ZIMNIEWSKA, M.; KOZŁOWSKI, R; BATOG, J. Nanolignin modified linen fabric as a multifunctional product. **Mol. Cryst. Liq. Cryst.** [S.l.], v.484, p.43-409, 2008.

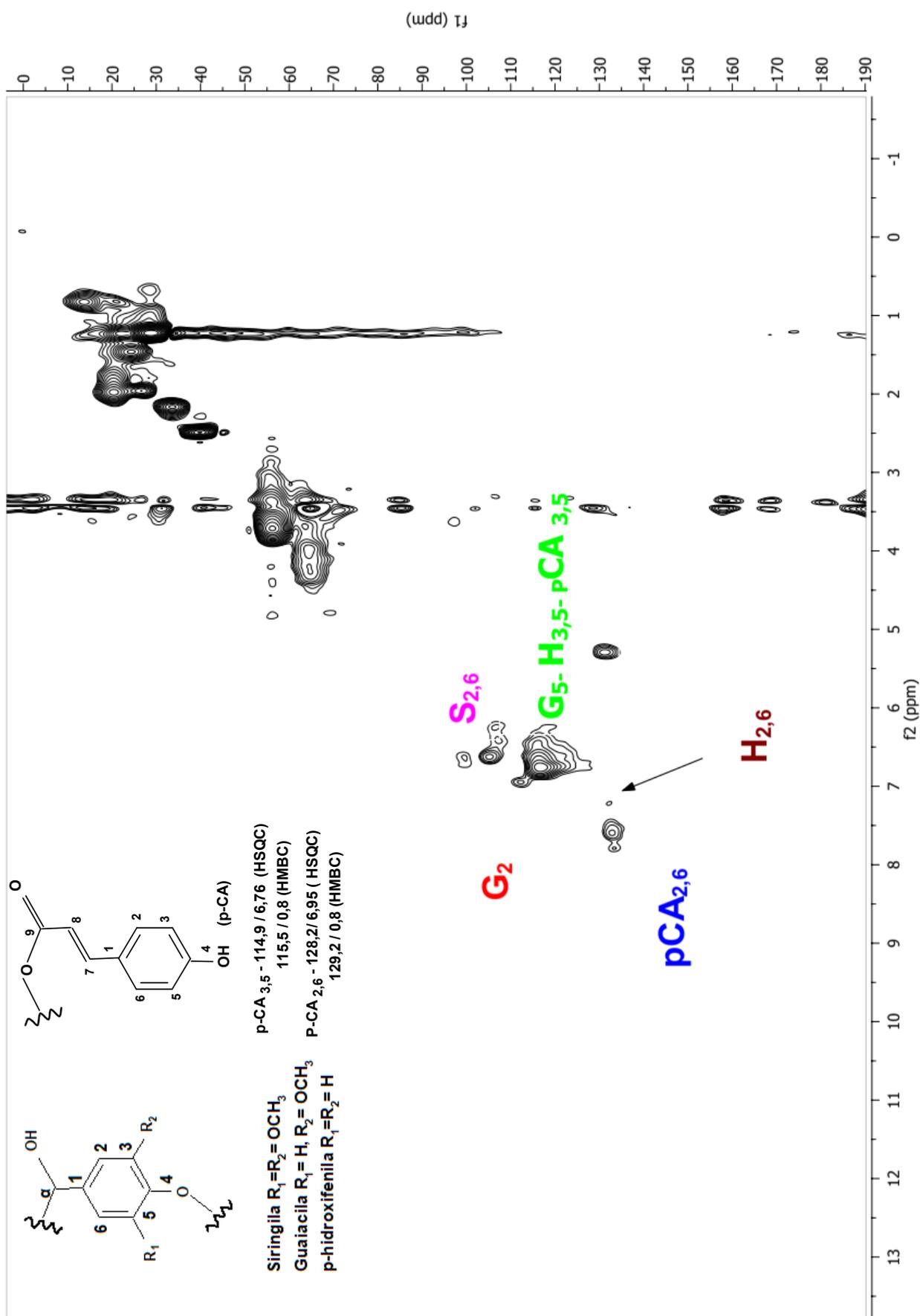
APÊNDICE A- ESQUEMA DE OBTENÇÃO DOS PRODUTOS



APÊNDICE B - ESPECTRO HSQC DA AMOSTRA LE



APÊNDICE C - ESPECTRO HSQC DA AMOSTRA PE-10



APÊNDICE D - ESPECTRO HSQC DA AMOSTRA LAE

