



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Queirós Correia Marques

**ECONOMIA CIRCULAR NA VALORIZAÇÃO DO LICOR
NEGRO**

**Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente, na área de
Especialização em Tecnologia e Indústria Sustentável, orientada pelo
Professor Doutor Licínio Manuel Gando de Azevedo Ferreira e pela Mestre
Manorma Sharma, apresentada ao Departamento de Engenharia Civil da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2022

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
Departamento de Engenharia Civil

Joana Queirós Correia Marques

Economia Circular na Valorização do Licor Negro

Circular Economy in the Valorization of Black Liquor

Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiente, na área de Especialização em Tecnologia e Indústria Sustentável,
orientada pelo Professor Doutor Licínio Manuel Gando de Azevedo Ferreira e pela Mestre Manorma Sharma.

Esta Dissertação é da exclusiva responsabilidade do seu autor. O Departamento de Engenharia Civil da FCTUC
declina qualquer responsabilidade, legal ou outra, em relação a erros ou omissões que possa conter.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projeto Inpactus - Produtos Inovadores e Tecnologias de Eucalipto, Projeto n.º 21 874 financiado em Portugal 2020 através do Fundo de Desenvolvimento Regional (FEDER), Compete 2020, n.º 246/Eixo II/2017.

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Agradecimentos

A realização deste trabalho representa um marco importante na minha vida e o culminar de meses de investigação, análise e aprendizagens. Convicta da importância da presente Dissertação, acredito que a realização da mesma não seria possível sem a colaboração, empenho e compreensão de múltiplas pessoas. Neste sentido, quero gratificar-vos pela vossa paciência, apoio e acima de tudo, por nunca desistirem de mim:

À minha família, especialmente aos meus pais, irmão e avós, por me terem proporcionado este percurso académico, por todo o amor e apoio absoluto e por serem um exemplo para mim;

Aos meus amigos, pelos momentos de riso incontrolável, pelos desabafos e por estarem sempre lá para mim;

Ao Professor Doutor Licínio Ferreira, pela orientação, disponibilidade e sugestões construtivas demonstradas ao longo da execução deste trabalho;

À Manorma Sharma, pelo papel crucial que teve na minha orientação, pelo tempo dedicado e por toda a paciência durante este trabalho. Sem ela não teria sido possível.

A todos vós, o meu sincero **Obrigada!**

Resumo

A economia circular é um conceito fundamental para um crescimento económico sustentável. Como tal, nesta dissertação é abordado um exemplo da promoção de uma economia circular na indústria da pasta e papel, ao valorizar um dos seus subprodutos: o licor negro.

Um dos constituintes do licor negro é a lenhina. A partir desta é possível produzir uma gama alargada de produtos de valor acrescentado, apresentando diversas aplicações em numerosos campos. Neste sentido, o trabalho desenvolvido nesta dissertação teve como principal objetivo a produção de nanopartículas a partir de lenhina isolada do licor negro e a sua aplicação.

Foram sintetizadas nanopartículas de lenhina através de métodos experimentais de *self-assembly* e precipitação ácida, segundo a literatura. As partículas resultantes de *self-assembly* apresentaram formas esféricas, tamanhos entre 177 nm e 489 nm e conteúdo fenólico entre $2,97 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL e $3,06 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL. Por outro lado, a morfologia das nanopartículas resultantes de precipitação ácida não foi possível observar com clareza, tendo estas apresentado tamanhos entre 80 nm a 129 nm e conteúdo fenólico entre $1,50 \times 10^{-6}$ mgGAE/mL e $3,00 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL.

Foram analisadas as condições ótimas de preparação de nanopartículas para um método experimental elaborado. Através do software JMP® Pro 16, verificou-se que a concentração de lenhina provoca um maior efeito no conteúdo fenólico, seguida do pH e da concentração de surfatante. Por outro lado, o pH possui maior relevância no tamanho das partículas, seguido da concentração de surfatante e da concentração de lenhina.

Os valores desejáveis para uma minimização do tamanho das nanopartículas e uma maximização do conteúdo fenólico são 422,96 nm e $4,53 \times 10^{-3}$ mgGAE/ml, respetivamente. Estes valores seriam alcançados com concentração de lenhina de 35 mg/mL, concentração de surfatante de 10 % (m/v lenhina) e pH de 5.

Concluiu-se que surfatantes não produzem efeitos significativos na morfologia, tamanho, conteúdo fenólico e estabilidade das nanopartículas.

Foi avaliada a atividade antibacteriana das nanopartículas de lenhina contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Apenas ocorreu uma pequena atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Economia circular, lenhina, planeamento fatorial completo, *self-assembly* e precipitação ácida, nanopartículas.

Abstract

The circular economy is a fundamental concept for sustainable economic growth. Therefore, this thesis shows a case study of promotion of circular economy in the pulp and paper industry, by valuing one of its byproducts: black liquor.

One of the components of black liquor is lignin. From lignin, it is possible to produce a wide range of value-added products, presenting different applications in numerous fields. In this sense, the work developed in this dissertation had as main objective the production of nanoparticles from lignin isolated from black liquor and its application.

Lignin nanoparticles were synthesized through experimental methods of *self-assembly* and acid precipitation, according to the literature. The resulting particles of *self-assembly* showed spherical shapes, sizes between 177 nm and 489 nm and phenolic content between 2.97×10^{-5} mgGAE/mL and 3.06×10^{-5} mgGAE/mL. On the other hand, the morphology of the nanoparticles resulting from acid precipitation couldn't be clearly observed, having presented sizes between 80 nm and 129 nm and phenolic content between 1.50×10^{-6} mgGAE/mL and 3.00×10^{-5} mgGAE/mL.

The optimal conditions for the preparation of nanoparticles were analyzed for an elaborate experimental method. Using the JMP® Pro 16 software, it was found that lignin concentration has a greater effect on phenolic content, followed by pH and surfactant concentration. On the other hand, pH has greater relevance in particle size, followed by surfactant concentration and lignin concentration.

The desirable values for minimizing nanoparticle size and maximizing phenolic content are 422.96 nm and 4.53×10^{-3} mgGAE/ml, respectively. These values would be achieved with a lignin concentration of 35 mg/mL, a surfactant concentration of 10% (m/v lignin) and a pH of 5.

It was concluded that surfactants does not produce significant effects on the morphology, size, phenolic content and stability of nanoparticles.

The antibacterial activity of lignin nanoparticles against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was evaluated. There was only a small activity against the bacterium *Staphylococcus aureus*.

Key words: Circular economy, lignin, full-factorial design, self-assembly and acid precipitation, nanoparticles.

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Motivação e enquadramento temático	1
1.2	Objetivos	2
1.3	Estrutura da dissertação	3
2	Fundamentos teóricos.....	4
2.1	Gestão e valorização de resíduos	4
2.2	Economia circular	5
2.2.1	Importância da economia circular na indústria da pasta e papel	7
2.3	Processo kraft.....	8
2.3.1	Ciclo da pasta	9
2.3.2	Ciclo de recuperação do licor negro	9
2.4	Licor negro.....	10
2.5	Estrutura e composição química da madeira	11
2.6	Lenhina	14
2.6.1	Tipos de lenhina	15
2.6.2	Valorização da lenhina	17
2.6.3	Nanopartículas de lenhina	20
3	Estado da arte	21
3.1	Métodos de preparação de nanopartículas de lenhina.....	21
3.1.1	Método <i>Self-assembly</i>	21
3.1.2	Método de troca de solvente com recurso a membranas de diálise.....	23
3.1.3	Método de precipitação ácida	24
3.1.4	Método de polimerização	25
3.1.5	Método de ultrassom	26
3.1.6	Método de reticulação	26
3.1.7	Método baseado em CO ₂ como anti-solvente.....	27
3.2	Aplicações das nanopartículas de lenhina.....	29

3.2.1	Aplicações farmacêuticas e agrícolas	29
3.2.2	Absorventes UV	30
3.2.3	Nanocompostos híbridos	30
3.2.4	Agentes antioxidantes	31
3.2.5	Outras aplicações	32
4	Materiais e métodos	35
4.1	Materiais	35
4.1.1	Reagentes	35
4.1.2	Lenhina comercial	35
4.1.3	Membranas de diálise	35
4.2	Métodos de preparação de nanopartículas de lenhina.....	36
4.2.1	<i>Self-assembly</i>	36
4.2.2	Precipitação ácida	37
4.3	Otimização das propriedades das nanopartículas	38
4.3.1	Método experimental para otimização das propriedades das nanopartículas.....	38
4.4	Efeito da adição de surfatante nas nanopartículas	40
4.5	Caracterização das nanopartículas de lenhina	40
4.5.1	SEM (Microscopia eletrónica de varrimento)	40
4.5.2	TEM (Microscopia eletrónica de transmissão).....	41
4.5.3	DLS (Dynamic Light Scattering)	41
4.5.4	Potencial Zeta	41
4.5.5	Método DPPH	41
4.5.6	Testes de atividade antibacteriana	42
5	Resultados e discussão	44
5.1	Caracterização das nanopartículas preparadas.....	44
5.1.1	Morfologia das nanopartículas através de SEM	44
5.1.2	Morfologia das nanopartículas através de TEM.....	46
5.1.3	Tamanho das nanopartículas através de DLS.....	48
5.1.4	Conteúdo fenólico das nanopartículas	51
5.2	Análise estatística da otimização das propriedades das nanopartículas.....	52

5.2.1	Efeito no conteúdo fenólico.....	54
5.2.2	Efeito no tamanho das partículas.....	56
5.2.3	Apresentação das condições ótimas	57
5.3	Efeito da adição de surfatante nas nanopartículas	58
5.3.1	Tamanho das partículas pelo DLS.....	59
5.3.2	Estabilidade das nanopartículas pelo Potencial Zeta.....	61
5.3.3	Morfologia das nanopartículas através de SEM.....	63
5.4	Atividade antibacteriana	63
6	Conclusões e sugestões para futuros trabalhos	65
6.1	Conclusões	65
6.2	Sugestões para futuros trabalhos.....	66
	Referências Bibliográficas.....	67
	Anexo A	A-1

Índice de figuras

Figura 2.1 - Hierarquia preferencial de gestão de resíduos sólidos.....	4
Figura 2.2 - Representação esquemática do modelo de economia linear.....	5
Figura 2.3 - Representação esquemática do modelo de economia circular.....	6
Figura 2.4 - Produção de resíduos sólidos no processo industrial ao longo dos anos.	7
Figura 2.5 - Destino dos resíduos sólidos produzidos ao longo dos anos.	8
Figura 2.6 - Processo kraft.....	10
Figura 2.7 - Secção transversal de um tronco de árvore com os seus diversos tecidos.....	12
Figura 2.8 - Precursores da lenhina.	14
Figura 3.1 - Preparação de nanopartículas de lenhina via <i>self-assembly</i> com a adição de ciclohexano.....	22
Figura 3.2 - Preparação de nanopartículas de lenhina via <i>self-assembly</i> com a adição de água.	23
Figura 3.3 - Preparação de nanopartículas de lenhina por de troca de solvente através de membranas de diálise.....	24
Figura 3.4 - Preparação de nanopartículas de lenhina por precipitação ácida.....	25
Figura 3.5 - Exemplo de preparação de nanopartículas de lenhina por reticulação.	27
Figura 3.6 - Preparação de nanopartículas de lenhina por precipitação na presença de CO ₂ como anti-solvente.	28
Figura 4.1 - Procedimento experimental utilizado no estudo da otimização das propriedades das nanopartículas.....	39
Figura 5.1 - Análise SEM de nanopartículas preparadas por <i>self-assembly</i> pelo primeiro método de 4.2.1.	45
Figura 5.2 - Análise SEM de nanopartículas preparadas por precipitação ácida através do: a) primeiro procedimento de 4.2.2.....	46
Figura 5.3 - Análise TEM de nanopartículas preparadas por <i>self-assembly</i> pelo primeiro método de 4.2.1.	47
Figura 5.4 - Análise TEM de nanopartículas preparadas por precipitação ácida.....	47
Figura 5.5 - Tamanho das nanopartículas em função da velocidade de gotejamento de água destilada.....	48
Figura 5.6 - Análise DLS da distribuição do tamanho das nanopartículas preparadas por <i>self-assembly</i>	49
Figura 5.7 - Tamanho das nanopartículas em função da concentração de SDS.....	50
Figura 5.8 - Análise DLS da distribuição dos tamanhos das nanopartículas preparadas por precipitação ácida.	50
Figura 5.9 - Conteúdo fenólico total em função da velocidade de gotejamento.	51

Figura 5.10 - Conteúdo fenólico em função da concentração de SDS.....	52
Figura 5.11 - Nanopartículas formadas pelo método experimental descrito na secção 4.3.1. .	53
Figura 5.12 - Efeito dos fatores e suas interações no conteúdo fenólico das nanopartículas. .	55
Figura 5.13 - Regressão linear entre os valores de conteúdo fenólico previstos pelo modelo matemático e os valores experimentais para as nanopartículas preparadas.	55
Figura 5.14 - Efeito dos fatores e suas interações no tamanho das nanopartículas.....	56
Figura 5.15 - Regressão linear entre os valores do tamanho previsto pelo modelo matemático e os valores experimentais para as nanopartículas preparadas.....	57
Figura 5.16 - Condições ótimas de preparação de nanopartículas para o método em estudo e correspondentes valores de conteúdo fenólico e tamanho de partículas.	58
Figura 5.17 - Análise DLS da distribuição dos tamanhos das nanopartículas preparadas.	60
Figura 5.18 - Análise do potencial zeta das nanopartículas preparadas.	61
Figura 5.19 - Análise SEM de nanopartículas preparadas.....	62
Figura 5.20 - Resultados da atividade antibacteriana dos procedimentos descritos em 4.5.6..	63

Índice de quadros

Quadro 2.1 - Compostos típicos presentes no licor negro kraft.	11
Quadro 2.2 - Composição química da madeira das espécies folhosas, resinosas e da <i>E. globulus</i>	12
Quadro 2.3 - Tipos de lenhinas técnicas, características e respetivas aplicações.....	19
Quadro 3.1 - Revisão de algumas publicações relativas a diferentes métodos de preparação de nanopartículas de lenhina e respetiva aplicação.	33
Quadro 4.1 - Reagentes utilizados, fórmula química e respetivo fornecedor.....	35
Quadro 4.2 - Fatores e níveis usados para a otimização do planeamento experimental.	38
Quadro 4.3 - Condições experimentais da preparação de nanopartículas.	39
Quadro 5.1 - Condições experimentais da preparação de nanopartículas e respetivo tamanho e conteúdo fenólico.	54
Quadro 5.2 - Condições experimentais da preparação de nanopartículas e respetivo tamanho e conteúdo fenólico.	59

1 Introdução

1.1 Motivação e enquadramento temático

A utilização racional dos recursos naturais, aliada à responsabilidade ambiental é um dos maiores desafios da humanidade atualmente, dado que o crescimento exponencial da população tem gerado um aumento de produção industrial e, conseqüentemente, um aumento de produção de resíduos, sendo o aterro o seu principal destino. Se com este aumento de produção não existirem tentativas de substituição de recursos naturais por materiais valorizados, a exaustão da natureza poderá ocorrer a taxas bastante preocupantes em termos de sustentabilidade (Angulo et al., 2001). Deste modo, o estabelecimento de soluções técnicas e economicamente viáveis para a redução, reutilização ou reciclagem dos resíduos gerados é uma das prioridades de investigação e desenvolvimento para o setor industrial, de acordo com o Plano Nacional de Gestão de Resíduos (PNGR 2030). Existe uma hierarquia preferencial para a gestão de resíduos, na qual posteriormente à prevenção, surge a redução, a reutilização e a reciclagem, a recuperação energética e, finalmente, a deposição apropriada dos resíduos (APA, Plano Nacional de Gestão de Resíduos 2030, 2020).

Neste contexto, surge um conceito inovador: a economia circular. A economia circular é um modelo de desenvolvimento sustentável, baseada no princípio de “fechar o ciclo de vida” dos produtos, permitindo melhorar a gestão, tanto de recursos, como de resíduos. Um dos seus objetivos é promover relações entre empresas de modo que uma possa utilizar os resíduos de outra como subproduto no seu processo produtivo (eco.nomia, 2022).

A indústria da pasta e papel é uma das mais fortes marcas de Portugal no mercado europeu e no mundo, responsável por 1,2 % do PIB nacional, cerca de 4,5 % do PIB industrial e 4,3 % de todas as exportações portuguesas de mercadorias. Este setor assume-se assim, como um dos mais importantes para a economia nacional (CELPA, 2020). As principais empresas nacionais, neste ramo, são o Grupo Portucel Soporcel e a Altri, sendo que a última se dedica apenas à produção e venda de pasta (Pereira, 2016).

Desta forma, a importância da implementação e desenvolvimento da economia circular no setor da pasta, papel e cartão nacional é fundamental para um crescimento económico sustentável. Um dos subprodutos da indústria papeleira, o licor negro, é um recurso com grande potencial de recuperação de biopolímeros de valor acrescentado, como a lenhina e polissacarídeos. A lenhina representa uma abundante fonte renovável, permitindo a produção de uma gama alargada de produtos de valor acrescentado, apresentando diversas aplicações em numerosos campos, tais como: energia e refinaria; aditivos de cimento; fibras de carbono; carvão ativado;

resinas fenólicas; entre outros. Estas aplicações têm vindo a ser estudadas nas últimas décadas, no entanto, a valorização da lenhina ainda é um desafio na indústria devido à sua inerente variabilidade, heterogeneidade, cor e baixa reatividade (Ferreira, 2019).

Neste sentido, o desenvolvimento de nanopartículas a partir da lenhina constitui uma alternativa que tem sido explorada recentemente para várias aplicações, como proteção UV; pesticidas; fertilizantes; produtos farmacêuticos; adsorção de metais pesados; atividades antioxidantes e antibacterianas; etc. Estes produtos em escala nano contribuem para uniformizar a forma e as dimensões das partículas a partir da formação controlada de agregados macromoleculares com dispersão de tamanhos definida, controlando assim, uma das variáveis que limita a aplicação industrial da lenhina como matéria-prima (Figueiredo et al., 2018).

A produção de nanopartículas de lenhina a partir de um subproduto abundante na indústria papeleira (licor negro) é um exemplo de promoção da economia circular, de forma a proporcionar a viabilidade técnica e económica da lenhina. A compreensão dos processos de formação das nanopartículas, a sua caracterização e a aplicação prática dos produtos fornecem informações importantes para a substituição gradual de matérias-primas fósseis por fontes renováveis.

1.2 Objetivos

O objetivo geral da presente dissertação consiste na produção de nanopartículas a partir de lenhina isolada do licor negro e na sua caracterização quanto às suas propriedades e, desta forma, comprovar a sua viabilidade na aplicação em produtos de valor acrescentado, promovendo assim a economia circular na valorização de subprodutos da indústria papeleira.

Os objetivos específicos são:

- Análise da gestão e valorização de resíduos, reforçando a importância da economia circular;
- Análise da indústria papeleira em Portugal no que concerne à gestão de recursos e de resíduos;
- A revisão do estado da arte sobre os métodos de síntese de nanopartículas de lenhina, bem como as suas diversas aplicações;
- Preparação e caracterização de nanopartículas através de técnicas apropriadas;
- Determinação das condições ótimas de síntese de nanopartículas de lenhina para o caso de estudo;
- Análise de possíveis aplicações das nanopartículas de lenhina preparadas.

1.3 Estrutura da dissertação

O presente trabalho está dividido em seis capítulos. O primeiro, inclui a introdução, onde é apresentada a motivação e o enquadramento do tema, bem como os objetivos e estrutura da dissertação.

No segundo capítulo, abordam-se os fundamentos teóricos associados ao tema, nomeadamente a hierarquia preferencial de gestão de resíduos para alcançar as metas definidas pelo PNGR 2030; as principais diferenças entre os modelos de economia linear e economia circular; a importância da economia circular na indústria da pasta e papel; é descrito o processo kraft; as características do licor negro; a estrutura e composição química da madeira e, por último, é dado destaque à lenhina, abordando os seus diferentes tipos e formas de valorização.

O terceiro capítulo consiste num levantamento de vários estudos publicados na literatura relacionados com os processos de síntese de nanopartículas de lenhina e as suas possíveis aplicações. São abordados os métodos *self-assembly*; troca de solvente; precipitação ácida; polimerização; ultrassom; reticulação e o método baseado em CO₂ como anti-solvente. Quanto à aplicação das nanopartículas, são referidas aplicações farmacêuticas e agrícolas; como absorventes de radiação UV; em nanocompostos híbridos; como agentes antioxidantes, e outras aplicações, como por exemplo, agentes antibacterianos; adsorventes para remover iões de metais pesados e agentes anticorrosivos.

No quarto capítulo são apresentados todos os materiais, equipamentos utilizados e procedimentos experimentais adotados em todas as etapas do trabalho. Inicialmente, foram preparadas nanopartículas de lenhina a partir de alguns procedimentos experimentais de *self-assembly* e precipitação ácida, segundo a literatura. Posteriormente, foi elaborado um procedimento experimental para otimização das nanopartículas, e analisado o efeito da adição de surfatante nas nanopartículas. As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas através da técnica SEM e TEM; DLS; método DPPH; testes de atividade antibacteriana e medido o potencial zeta.

No quinto capítulo, encontram-se os resultados experimentais e respetiva discussão, obtidos ao longo dos vários ensaios efetuados. São analisados os resultados do tamanho, morfologia das nanopartículas e conteúdo fenólico, a fim de comparar a capacidade antioxidante das mesmas. É feita uma análise estatística da otimização das propriedades das nanopartículas e apresentadas as condições ótimas. É discutido o efeito da presença de surfatante no tamanho e na estabilidade das nanopartículas e, por fim, avaliada a respetiva atividade antibacteriana.

Por fim, no sexto capítulo são apontadas as principais conclusões e algumas sugestões para futuros trabalhos.

2 Fundamentos teóricos

2.1 Gestão e valorização de resíduos

O uso intensivo de recursos naturais tem sido, desde sempre, efetuado sem preocupações com possíveis impactes ambientais e sem analisar possibilidades de reutilização de produtos e materiais. Um dos grandes problemas da atualidade a nível ambiental é o descarte de vários tipos de resíduos, sem qualquer separação ou gestão. Estes resíduos poderão acabar em aterros sanitários, incineradoras, ou até mesmo descartados sem qualquer regra. Ocorre, assim, uma perda de recursos que poderiam ser reaproveitados, reciclados, e incorporados no processo produtivo.

Os objetivos estratégicos do Plano Nacional de Gestão de Resíduos (PNGR) para 2030 consistem na prevenção da produção de resíduos ao nível da quantidade e perigosidade; na promoção da eficiência na utilização de recursos, contribuindo para uma economia circular e na redução dos impactes ambientais negativos, através de uma gestão de resíduos integrada e sustentável (APA, Plano Nacional de Gestão de Resíduos 2030, 2020).

Deste modo, a gestão adequada de resíduos rege-se por uma hierarquia que se encontra esquematizada na Figura 2.1, onde a prevenção da geração de resíduos, seguida da sua redução, reutilização e reciclagem são as estratégias fundamentais para o alcance das metas descritas. A eliminação em aterro, a seguir à valorização energética, será a hipótese menos vantajosa como destino final dos resíduos, devido à perda do valor potencial de alguns elementos e pela ocupação de grandes áreas. No entanto, este ainda é o destino mais utilizado para os resíduos sólidos (após o encerramento crescente de lixeiras).

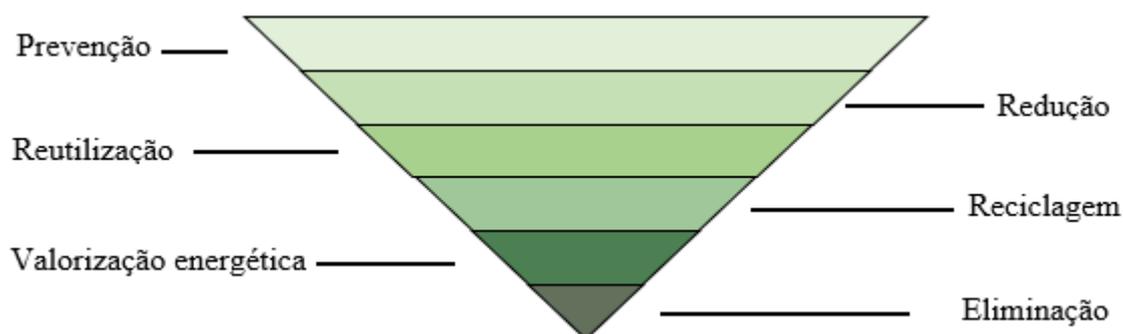


Figura 2.1 – Hierarquia preferencial de gestão de resíduos sólidos.

Alguns resíduos são recursos importantes com valor, tanto ambiental como económico, dado que podem ser utilizados como fonte de matéria-prima em vários cenários, permitindo assim, o desenvolvimento de novos materiais ou produtos, em vez de serem obtidos através de outras matérias-primas, que culminariam em maiores custos.

2.2 Economia circular

O conceito de economia circular surge como uma alternativa ao modelo da economia linear, utilizado desde a Revolução industrial, que tem como princípio o descarte de produtos depois de utilizados. De acordo com este modelo, todos os produtos têm um ciclo linear, iniciado com a extração de matérias-primas, seguida da produção, distribuição e consumo dos produtos e, por fim, o seu descarte como resíduos. Neste modelo não existe qualquer previsão de reutilização ou reciclagem dos produtos, como esquematizado na Figura 2.2 (eco.nomia, 2022).



Figura 2.2 – Representação esquemática do modelo de economia linear.

Esta visão de modelo económico não é sustentável, visto que, tanto os recursos naturais, como as fontes energéticas não são ilimitadas, podendo esgotar-se rapidamente com o aumento populacional e aumento da procura, além das consequências negativas ao nível do meio ambiente. Estas desvantagens tornam, portanto, a economia linear num modelo não viável.

A economia circular é um conceito estratégico que se baseia na redução, reutilização, recuperação e reciclagem de materiais e energia, sendo vista como um conceito base de promoção da dissociação entre o crescimento económico e o aumento no consumo de recursos.

A economia circular ultrapassa o âmbito e foco estrito das ações de gestão de resíduos, visando uma ação mais ampla, focada na manutenção do valor de produtos e materiais durante o maior período possível no ciclo económico. Visa assim, o desenvolvimento de novos produtos e serviços economicamente viáveis e ecologicamente eficientes.

Cada etapa deste modelo contém princípios base específicos. Começando na fase do design, esta defende o desenho ou redesenho de produtos mais duradouros e cuja conceção utilize menos recursos, sendo projetados para vários ciclos de vida. Na fase da produção, são adotados processos de produção mais limpa, limitando a utilização de substâncias tóxicas. São também identificadas outras aplicações para subprodutos. Na distribuição, é importante existir uma organização de logística para partilha de redes de distribuição, escolhas mais sustentáveis de modos de transporte, bem como a redução do embalamento. Uma melhoria da eficiência energética, maximização do tempo útil dos produtos e otimização da reparação e reutilização podem ser alcançadas na fase de utilização. Por último, a fase de eliminação/reentrada no ciclo, é focada no *upcycling* (processo de reconversão de resíduos em novos materiais ou produtos de maior valor acrescentado) ou no *downcycling* (processo de reconversão de resíduos em novos materiais ou produtos de menor qualidade ou funcionalidade reduzida). As principais fases do modelo de economia circular encontram-se esquematizadas na Figura 2.3.

A economia circular possibilita, assim, múltiplas estratégias que podem ser combinadas na criação de valor, nomeadamente: novos modelos de negócio e desmaterialização; design e eco-conceção; produção “limpa” / eco-eficiência; extensão do ciclo de vida; reutilização, remanufatura e acondicionamento; simbioses industriais (urbanas, locais, regionais) e valorização de subprodutos e resíduos (eco.nomia, 2022).

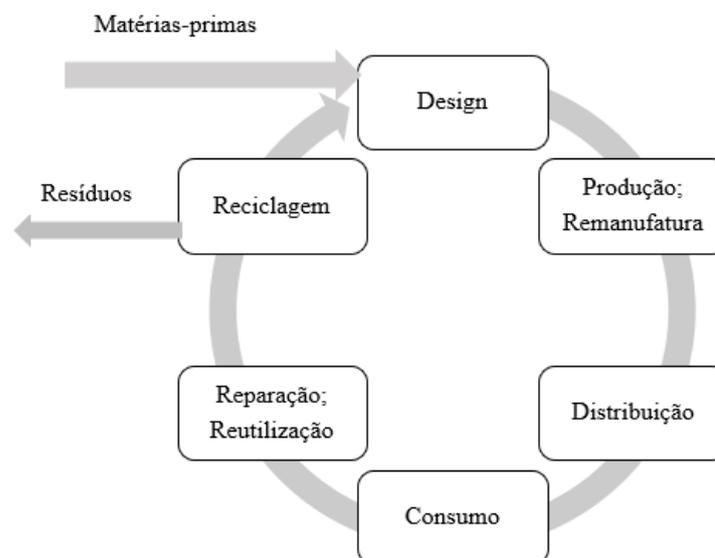


Figura 2.3 – Representação esquemática do modelo de economia circular.

2.2.1 Importância da economia circular na indústria da pasta e papel

A indústria da pasta e papel é uma das mais fortes marcas de Portugal no mercado europeu e no mundo, responsável por 1,2 % do PIB nacional, cerca de 4,5 % do PIB industrial e 4,3 % de todas as exportações portuguesas de mercadorias. Assume-se, assim, como um dos setores mais importantes para a economia nacional (CELPA, 2020).

Este setor industrial apresenta problemas ambientais, devido à grande quantidade de resíduos produzidos: aproximadamente 48 ton de resíduos por cada 100 ton de pasta produzida. Neste sentido, surge o interesse por uma das indústrias que mais resíduos produz a nível nacional e na sua potencial reintegração no sistema (Oliveira, 2009).

Os resíduos sólidos produzidos pelas indústrias da pasta e papel que utilizam o processo kraft, tal como apresentados na Figura 2.4, consistem em: resíduos resultantes do processamento da madeira; lamas do tratamento de efluentes (lamas primárias e secundárias), lamas inorgânicas (*grits, dregs* do licor verde); cinzas, escórias, poeiras e outros resíduos de caldeiras resultantes da queima de biomassa; resíduos da triagem de papel recuperado e da produção de pasta de papel a partir de papel recuperado e outros resíduos sólidos. Destes, os mais significativos são as lamas provenientes do tratamento de efluentes (Oliveira, 2009). Esta indústria não produz resíduos perigosos.

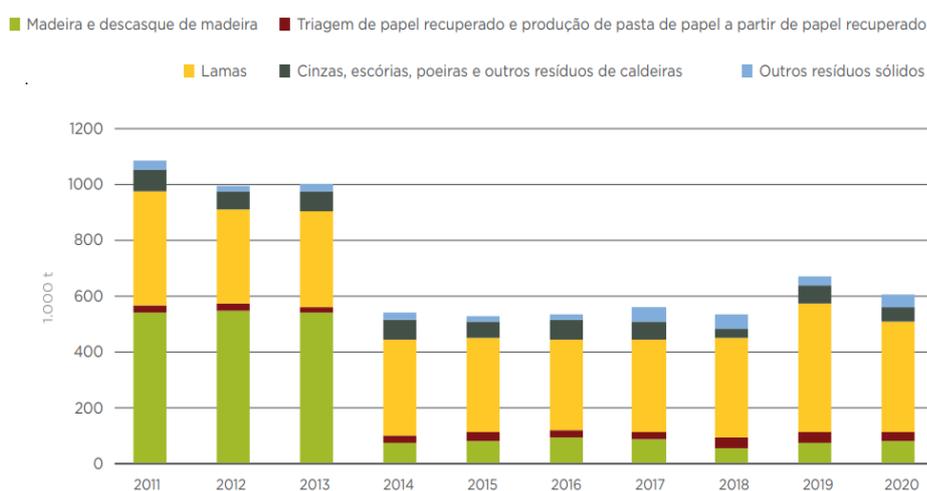


Figura 2.4 – Produção de resíduos sólidos no processo industrial ao longo dos anos. Fonte: (CELPA, 2020).

A quantidade e composição dos resíduos gerados apresentam um elevado potencial de poluição ambiental, para as regiões vizinhas e, apesar de uma taxa de valorização relativamente alta, os custos de gestão associados são ainda elevados, sendo que a deposição em aterro se encontra cada vez mais regulamentada.

Nos últimos anos, têm vindo a ser elaborados projetos de valorização interna e externa de redução da produção de resíduos, assim como, trabalhando na sua classificação e utilização como subprodutos, numa ótica de circularidade. As unidades industriais possuem aterros próprios controlados e monitorizados, para uma deposição segura dos resíduos e dispõe de mecanismos para a sua separação por tipo, o que permite o tratamento, reciclagem, reutilização ou valorização energética de parte dos resíduos produzidos, tentando reduzir assim, a necessidade de deposição em aterro (CELPA, 2020).

Na Figura 2.5 observam-se os vários destinos dos resíduos sólidos produzidos ao longo dos anos.

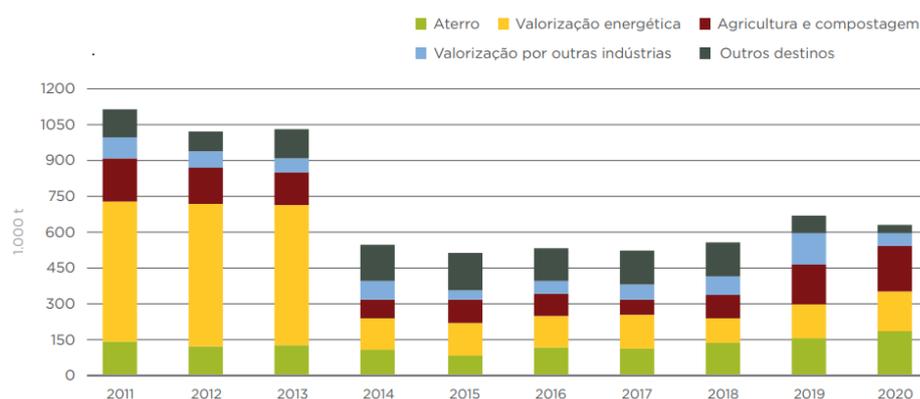


Figura 2.5 – Destino dos resíduos sólidos produzidos ao longo dos anos. Fonte: (CELPA, 2020).

2.3 Processo kraft

O processo kraft é o mais utilizado na produção de pastas químicas, sendo que o papel produzido a partir destas apresenta maior resistência em termos físico-químicos. Neste processo a madeira pode ser introduzida com a casca e, para além disso, contém um ciclo de recuperação de químicos. Existem dois ciclos, como esquematizado na Figura 2.6.

2.3.1 Ciclo da pasta

Este ciclo inicia-se com a receção da madeira na fábrica, onde o principal objetivo é o corte dos toros em aparas e o seu descasque para os reagentes químicos penetrarem melhor. Para um cozimento melhorado, as aparas são crivadas para serem obtidas dimensões semelhantes (Carvalho, 1999) (Vakkilainen e Tran, 2015).

O cozimento tem como objetivo a degradação dos constituintes não celulósicos da madeira, principalmente a lenhina. As aparas são introduzidas num digestor, sofrendo um cozimento com licor branco (sulfureto de sódio e hidróxido de sódio) a condições de pressão e temperatura elevadas. Aqui, a lenhina é libertada da celulose e dissolvida no licor branco, enquanto as aparas, já sem grande parte da lenhina, continuam o trajeto ao longo do digestor. A lenhina misturada com o licor branco é retirada a meio, designando-se agora por licor negro, dada a cor escura que apresenta devido à dissolução de lenhina. Assim que o conteúdo de lenhina residual desejado é alcançado, a pasta é retirada e o ciclo repete-se (Bajpai, 2018) (Bajpai, 2010) (Vakkilainen e Tran, 2015).

Após o cozimento, o licor negro resultante segue para um ciclo de recuperação, sendo que na base do digestor é adicionado licor de lavagem frio, circulando em contracorrente em relação às aparas para uma melhor eficiência. Esta é uma etapa muito importante, porque caso não haja uma boa remoção dos restos de sólidos dissolvidos na pasta, a fase de branqueamento será afetada, levando ao aumento dos preços dos processos da produção do papel (Bajpai, 2018) (Bajpai, 2010) (Vakkilainen e Tran, 2015).

A pasta castanha resultante é então branqueada, para que o papel atinja os padrões de brancura exigidos. Posteriormente, a pasta é drenada para eliminar a água em excesso, prensada e seca. No fim, é cortada e embalada, estando pronta para utilização no fabrico de papel (Bajpai, 2018) (Bajpai, 2010) (Vakkilainen e Tran, 2015).

2.3.2 Ciclo de recuperação do licor negro

O processo de recuperação química é uma parte complexa e muito importante em termos ambientais, sendo um componente crucial no processo de pasta, dado que recupera os químicos usados no licor de cozimento para reutilizá-los, impedindo que sejam descarregados no meio ambiente.

Os químicos inorgânicos presentes no licor negro fraco são recuperados e recirculados para o processo, sendo que os orgânicos dissolvidos são utilizados como combustível na produção de vapor e eletricidade. O licor negro fraco vindo do digestor é concentrado em evaporadores para

que possa ser queimado eficazmente na caldeira de recuperação, onde tem o papel de combustível. A parte inorgânica que é formada nesta combustão, frequentemente designada por *smelt*, é dissolvida em água, formando o licor verde.

Este é enviado para caustificação, resultando hidróxido de sódio da reação de carbonato de cálcio com hidróxido de cálcio. O carbonato de cálcio precipitado, a lama de cal, é separado do resto através de um clarificador, sofrendo uma calcinação de seguida, para poder retornar ao processo como agente de caustificação do licor verde (Reis et al., 2012).

Deste modo, o licor branco é regenerado, contendo grande parte dos reagentes químicos utilizados no cozimento, podendo retornar como alimentação no digestor.

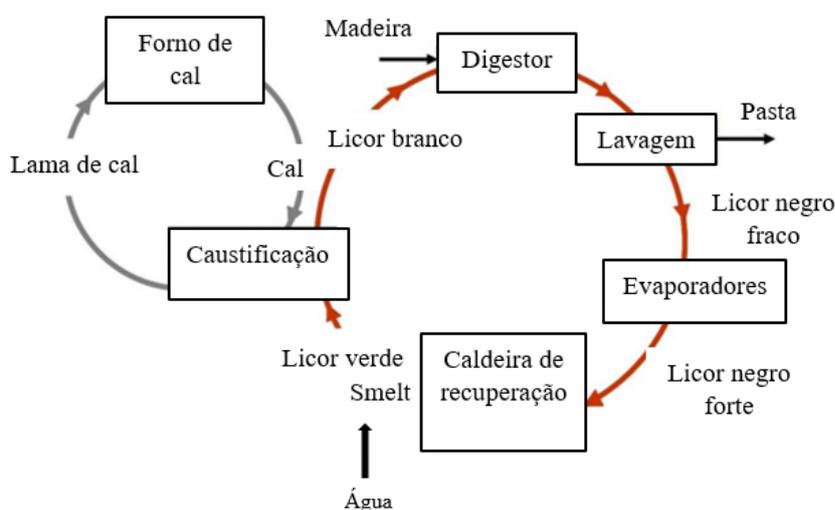


Figura 2.6 – Processo kraft. Adaptado de: (Vakkilainen e Tran, 2015).

2.4 Licor negro

O licor negro é um líquido bastante viscoso, sendo que quanto maior a quantidade de lenhina e hemiceluloses envolvidas, maior a sua viscosidade, já que estes dois componentes correspondem à maior fração da composição do licor negro (Bajpai, 2015). Obtido a partir do digestor e lavagem da pasta no processo kraft, apresenta-se como uma solução aquosa constituída por resíduos orgânicos como a lenhina; polissacarídeos; ácidos carboxílicos; extrativos e alguns químicos usados no processo, estando representado no Quadro 2.1 a constituição típica de um licor negro kraft. As propriedades químicas do licor negro estão diretamente relacionadas com estes componentes.

Quadro 2.1 - Compostos típicos presentes no licor negro kraft (Kevlich et al., 2017).

Composto	Sólidos totais (%)
Lenhina	25-54
Hemiceluloses parcialmente degradadas	0,1-9
Hemiceluloses bastante degradadas (ácidos carboxílicos)	25-35
Extrativos	0,3-6,7
Inorgânicos	14-33
Carbonato de sódio	6,6-12,3
Hidróxido de sódio	1,3-2,4
Tiosulfato de sódio	0,5-4,1
Sulfato de sódio	0,9-8,3
Cloreto de sódio	0,5
Dióxido de silício	0,2-0,7

O licor negro é o principal subproduto da indústria da pasta e papel, e não um resíduo, já que pode ser recirculado no processo industrial (APA, 2022). No entanto, este pode ser valorizado de outras formas. Ao ser valorizado um dos componentes do licor negro, o próprio é valorizado, sendo que o objetivo da presente dissertação consiste na valorização da lenhina, através da aplicação das suas nanopartículas, promovendo assim uma economia circular nesta indústria.

Para isto, a lenhina tem de ser isolada do licor negro, constituindo uma fase complexa, devido à estrutura da lenhina. Deste modo, é importante que os processos deste isolamento estejam incorporados nesta indústria, para que se torne uma hipótese viável e industrialmente atrativa.

No que diz respeito aos processos de isolamento da lenhina kraft, o mais utilizado é o LignoBoost, em que o licor negro é acidificado e são formadas partículas de lenhina que podem ser posteriormente separadas através de filtração. O método é iniciado com a diminuição do pH do licor até 9, através da adição de dióxido de carbono. De seguida, este é lavado e filtrado com uma solução de ácido sulfúrico de pH aproximadamente 2, precipitando assim a lenhina. A lama resultante é filtrada novamente e lavada, estando pronta a ser utilizada (Ferreira, 2019).

2.5 Estrutura e composição química da madeira

A madeira pode ser utilizada como matéria-prima em vários contextos, devido à diversificação da sua estrutura celular. Uma das suas aplicações é na produção de pasta e papel, em que consoante o tipo de árvore, a madeira apresentará diferentes características e composições, que por sua vez irá afetar a qualidade e características da pasta obtida no final (Lisboa, 2008).

No setor de produção da pasta e papel, as fibras frequentemente utilizadas provêm de árvores designadas por Gimnospérmicas e Angiospérmicas Dicotiledóneas, cujo nome também poderá ser resinosas (ou *softwoods*) e folhosas (ou *hardwoods*), respetivamente. As fibras das resinosas são apelidadas de fibras longas e as das folhosas de fibras curtas. Cada um destes tipos de fibras fornece características diferentes ao papel, sendo que o das longas apresenta uma maior resistência mecânica, apesar de uma menor aptidão à impressão e suavidade.

A espécie de árvore folhosa *E. globulus*, do género *Eucalyptus* é a principal matéria-prima nesta indústria a nível nacional. A madeira da espécie *E. globulus* possui elevadas propriedades em termos de papel, graças à qualidade e quantidade de fibras no seu tronco. Na Figura 2.7 apresenta-se a secção transversal de um tronco de uma árvore, em que se podem observar seis tipos de componentes: medula, cerne, borne, câmbio, floema e ritidoma (Ferreira, 2000).

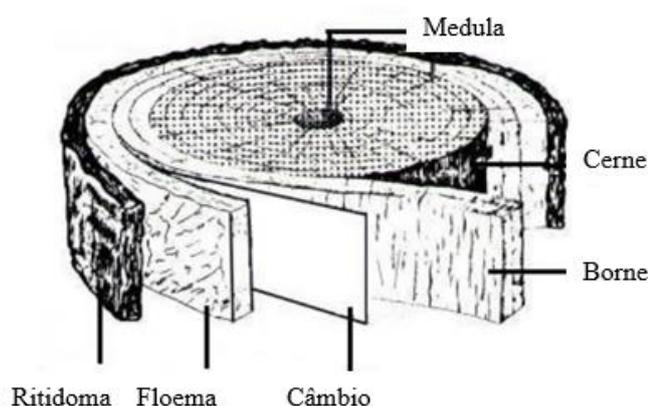


Figura 2.7 – Secção transversal de um tronco de árvore com os seus diversos tecidos.

Adaptado de: (Burger e Richter, 1991).

Os constituintes da madeira estão divididos por compostos de baixo peso molecular e elevado peso molecular. Os compostos de baixo peso molecular são substâncias orgânicas (extrativos) e inorgânicas (cinzas), e dos compostos de elevado peso molecular fazem parte os polissacarídeos (hemiceluloses e celulose) e a lenhina (Carvalho, 1999) (Ferreira, 2000). O Quadro 2.2 mostra a composição química da madeira das espécies folhosas, resinosas e da *E. globulus*, com o objetivo de analisar as suas diferenças, sendo que as características da *E. globulus* são de maior interesse para este trabalho.

Quadro 2.2 - Composição química da madeira das espécies folhosas, resinosas e da *E. globulus* (Pereira, 1988).

Componente	Folhosas (% m/m)	Resinosas (% m/m)	<i>E. globulus</i> (% m/m)
Celulose	42-49	41-46	47-58
Hemiceluloses	23-34	25-32	14-22
Lenhina	20-26	26-31	20-24
Extrativos	3-8	10-25	1-3
Cinzas	0,2-0,8	0,2-0,4	0,3-1

Os compostos de baixo peso molecular incluem orgânicos e inorgânicos, cuja quantidade depende da localização na parede celular, idade, origem e espécie. A quantidade de compostos orgânicos é determinada com base na sua solubilidade em solventes orgânicos, daí serem denominados de extrativos. As pastas com maior teor destes compostos apresentam baixos rendimentos, apresentando a característica de serem solúveis em licores e exigirem um maior consumo de reagentes. Quanto aos compostos inorgânicos, estes normalmente são designados por “cinzas” e constituem apenas 1% da madeira. Os sulfatos, fosfatos, oxalatos, carbonatos, silicatos de cálcio, potássio e magnésio fazem parte destes (Carvalho, 1999).

A celulose constitui a estrutura elementar das células das plantas e, para além de ser o componente natural mais importante em todas as plantas, é também o que se apresenta em maior quantidade na madeira (Lisboa, 2008). A celulose é um homopolímero linear e não ramificado, sendo que o seu grau de cristalinidade influencia as propriedades químicas e físicas das fibras, e por sua vez, a pasta e o papel resultante (Carvalho, 1999) (Ferreira, 2000).

As hemiceluloses pertencem aos componentes estruturais das paredes das células das plantas, onde são associadas a proteínas e compostos fenólicos. As hemiceluloses são macromoléculas que têm função de controlo da agregação da celulose. Estas estão ligadas entre si através de ligações glicosídicas, diferenciando-se da celulose devido às suas unidades, à sua estrutura amorfa e cadeias curtas normalmente ramificadas (Carvalho, 1999).

Por último, o composto de elevado peso molecular de maior interesse para a presente dissertação é a lenhina e, como tal, no tópico seguinte serão abordadas especificamente as suas características, tipos e formas de valorização.

2.6 Lenhina

A lenhina, a seguir à celulose é o componente mais importante e abundante das plantas. Confere rigidez aos tecidos das plantas, protegendo-as de ataques químicos ou bacterianos; transporta água e minerais e é responsável pela coesão das fibras na madeira. A sua composição na madeira pode variar entre 20-40% dependendo da espécie, tipo e principalmente do processo de extração. A lenhina é considerada uma macromolécula altamente ramificada, amorfa, parcialmente hidrofóbica, com um elevado peso molecular e uma estrutura tridimensional complexa, ainda por clarificar na sua totalidade. Não obstante, a lenhina consiste em unidades provenientes do fenilpropano, que estabelecem entre si ligações covalentes de forma aparentemente aleatória e complexa, ou seja, resulta da polimerização de três precursores: p-álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, cuja representação esquemática se encontra representada na Figura 2.8 (Simões, 2021).

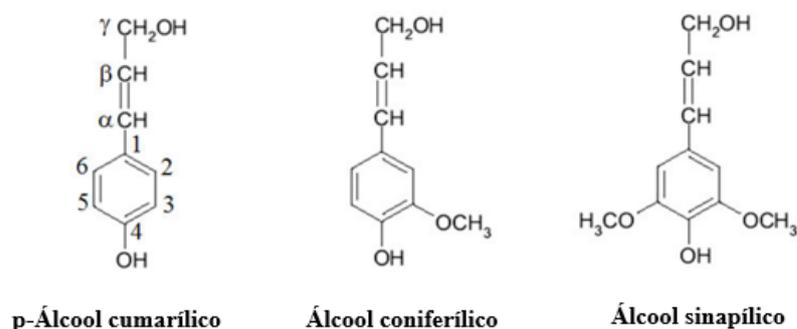


Figura 2.8 – Precursores da lenhina. Adaptado de: (Lisboa, 2008).

A composição química da lenhina varia consoante a espécie; o tecido dentro da mesma espécie; localização na parede celular e idade das células, apresentando diferentes proporções de unidades cumarila (p-álcool cumarílico), guaiacila (álcool coniferílico) e siringila (álcool sinapílico). A natureza destes monómeros e a combinação entre eles resulta numa grande variedade de grupos funcionais, possibilitando diferentes desenvolvimentos de tecnologias para aproveitamento da lenhina (Simões, 2021).

Apesar da sua natural abundância, a lenhina faz parte de um dos subprodutos da indústria da pasta e papel, sendo que todos os anos, cerca de 50 milhões de toneladas de lenhina são geradas nesta indústria. No entanto, a maioria é descartada como resíduo ou usada como combustível

para produzir calor e eletricidade, causando problemas ambientais e desperdício de recursos. Apenas 2% da lenhina produzida é isolada e efetivamente usada em diversos produtos de valor acrescentado. Teoricamente, a lenhina deveria ser considerada uma grande fonte de matéria-prima para vários materiais e utilizada em diversos campos, devido à sua aromaticidade, grupos funcionais reativos, excelente resistência a oxidação e radiação UV, elevada estabilidade térmica, biodegradabilidade e baixos custos. Porém, apenas uma pequena porção é utilizada, devido à grande complexidade da sua estrutura molecular; complexidade do seu isolamento, purificação, modificações químicas e caracterização, o que resulta numa maior dificuldade da sua aplicação em produtos de valor acrescentado. De qualquer maneira, é imperativo a investigação de novos métodos e aplicações da lenhina recuperada dos licores da indústria de pasta e papel, visto que proporciona benefícios ambientais e económicos (Tang et al., 2020).

Diferentes processos de separação/extração dão origem a lenhinas com diferentes propriedades, tais como solubilidade; peso molecular e grupos funcionais, que, por sua vez irão afetar a preparação e a aplicação de nanopartículas. Atualmente, existem cinco tratamentos para separação da lenhina: sulfito; kraft; organossolve; soda e hidrólise enzimática. As lenhinas industriais kraft, soda e lenhinho-sulfonatos são produzidas em grandes escalas comerciais a partir dos métodos LignoBoost, LignoForce e Howard. Já as lenhinas organossolve e de hidrólise apenas são produzidas em pequenas escalas laboratoriais (Tang et al., 2020). De seguida descrevem-se os diferentes tipos de lenhina; as suas principais propriedades e as diversas formas de valorização, sendo que estas informações se encontram resumidas no Quadro 2.3.

2.6.1 Tipos de lenhina

a) Lenhina Soda

A lenhina soda é produzida a partir do processo de pasta soda, normalmente usado no tratamento de plantas herbáceas como a palha de trigo, o bagaço da cana-de-açúcar e o linho. Este processo consiste na adição de uma solução aquosa de hidróxido de sódio de 13–16 (% m/m) e antraquinona (como catalisador), a temperaturas de 140-170 °C. O peso molecular da lenhina obtida varia entre 1000 e 3000 g/mol. A lenhina soda possui um grande conteúdo de ácido carboxílico, o que dificulta a sua recuperação através de centrifugação ou filtração. Por outro lado, esta não contém azoto na sua composição, o que é vantajoso para aplicações em produtos de valor acrescentado, como bioplásticos ou compostos (Tang et al., 2020).

b) Lenhina de hidrólise

A lenhina de hidrólise é obtida a partir de um processo de hidrólise, em que celulasas e hemicelulasas degradam a celulose e a hemicelulose na biomassa, deixando a lenhina como um resíduo sólido insolúvel. Tem as vantagens de não produzir efeitos prejudiciais ao ambiente e ser de baixo custo. Os produtos de lenhina obtidos apresentam baixa solubilidade em água e em alguns solventes orgânicos, no entanto é a lenhina que apresenta a estrutura mais idêntica à nativa. A lenhina de hidrólise pode ser aplicada industrialmente como dispersantes, aglutinantes, adsorventes e para produção de diversos químicos (Tang et al., 2020).

c) Lenhina Organossolve

A lenhina organossolve é obtida por tratamento da biomassa usando solventes orgânicos como agentes de deslenhificação. Neste processo, os solventes mais usados (acetona, etanol, metanol, THF, dioxano, etilenoglicol e ácidos orgânicos) são misturados com água, a temperaturas de 170-190°C. A lenhina formada tem o menor peso molecular comparada com os outros tipos de lenhinas; é livre de azoto e a estrutura nativa da lenhina é preservada. No entanto, a lenhina organossolve é difícil de produzir em larga escala, visto que provoca a corrosão do equipamento e, para além disso, envolve custos maiores em termos de solventes (Tang et al., 2020).

d) Lenhino-sulfonatos

Os lenhino-sulfonatos são obtidos a partir do processo de pasta ao sulfito, que envolve reações entre lenhina e sais de sulfito ou ácidos sulfurosos com sódio, magnésio ou cálcio como contra-íons, a 120-180 °C, em condições de pH neutro, ácido ou básico, por 1-5 horas. A adição de grupos hidrofílicos como os carboxílicos e fenólicos aumentam imenso a solubilidade em água. Para além disso, esta lenhina contém grupos hidrofóbicos, portanto, é considerada um surfatante aniónico. Devido à sua solubilidade favorável e alguma atividade superficial, tem vindo a ser utilizada em diversos campos comerciais como dispersante, podendo assim ser utilizada como fonte de matéria-prima. Por outro lado, tem as desvantagens da alteração da estrutura da lenhina e a baixa pureza após isolamento, com grande quantidade de cinzas (Tang et al., 2020).

e) Lenhina Kraft

A lenhina kraft é obtida a partir do processo de pasta kraft, pelo qual aproximadamente 85% da lenhina industrial é produzida. Este processo realiza-se em condições de pH e temperatura elevados. Primeiro, a lenhina é tratada com hidróxido de sódio e sulfureto de sódio, a temperaturas por volta dos 170 °C e valores de pH de 13-14, permitindo a sua solubilização. Depois, a lenhina é separada da solução alcalina por precipitação ácida, até valores de pH de 5-7,5. A lenhina kraft exibe uma grande pureza, no entanto apresenta uma fraca solubilidade em água, sendo apenas dissolvida sob condições alcalinas, o que a torna num material inativo, salvo se quimicamente modificada. Atualmente, esta lenhina é usada em vários dispersantes industriais e como biocombustíveis e bioquímicos (Tang et al., 2020).

A tecnologia LignoBoost foi desenvolvida para isolar lenhina de melhor qualidade a partir do licor negro. Este processo tem a vantagem de produzir lenhina de alta pureza, no entanto, o grau de contaminação depende das condições utilizadas no processo de produção (Pavaneli, 2020).

2.6.2 Valorização da lenhina

a) Lenhina como fonte de combustível

Devido à sua complexidade, a lenhina necessita de ser despolimerizada, através de métodos enzimáticos, térmicos ou de degradação catalítica, para promover o seu potencial químico total (Chuck et al., 2013). Assim, permitirá a sua utilização como combustível, aditivos de combustível ou precursores químicos. A indústria da pasta e papel utiliza a lenhina como fonte de combustível, através da combustão do licor produzido, para produzir eletricidade. No entanto, esta combustão gera também grandes quantidades de carbono, por isso, como alternativa mais sustentável, a lenhina poderá ser convertida em combustível a partir de gaseificação, gerando syngas, ou pirólise (Namane, 2016) (Ralph et al., 2007).

b) Lenhina como adsorvente de químicos

Recentemente, a remoção de poluentes tem vindo a ser uma das principais discussões no controlo dos impactes ambientais. A lenhina em estado bruto tem vindo a ser utilizada, com sucesso, como um adsorvente de metais pesados (Guo et al., 2008a). Esta contém sítios ativos

de adsorção, contendo grupos fenólicos e grupos carboxílicos, sendo que o primeiro tem uma grande afinidade para iões metálicos (Guo et al., 2008b).

c) Lenhina como fonte de materiais

A lenhina pode ser valorizada ao ser aplicada em diversos materiais, tais como um reforço de materiais de borracha, devido à sua baixa densidade. Num estudo, a lenhina foi modificada em nanopartículas, e a co-precipitação destas e latex resultou, com sucesso, na preparação de nanocompostos de lenhina/borracha (Setua et al., 2004).

Outros exemplos são a aplicação da lenhina em termoplásticos e a sua conversão em fibras de carbono, este último através de reações térmicas, de hidrogenólise, etc. (Gosselink et al., 2004).

d) Lenhina como fonte de carvão ativado

O carvão ativado é considerado o adsorvente mais antigo, devido à sua estrutura bastante porosa, possuindo uma grande área superficial interna. Como adsorvente, o carvão ativado tem sido usado, maioritariamente, na remoção de diversos contaminantes orgânicos e inorgânicos (Mourão et al., 2006).

A lenhina é um excelente precursor do carvão ativado, visto que esta é a maior fonte de formação de carvão durante o processo de produção de carvão ativado. É conhecido que o desenvolvimento e ampliação de microporos no carvão ativado é favorecido com a utilização de lenhina (Rodríguez-Mirasol et al., 1993).

No Quadro 2.3 abaixo representado, as abreviaturas para as lenhinas correspondem a: LS - Lenhina soda; LK – Lenhina Kraft; LH – Lenhina da hidrólise; LOS – Lenhina organossolve; L-S – Lenhino-sulfonatos.

Quadro 2.3 - Tipos de lenhinas técnicas, características e respectivas aplicações (Tang et al., 2020) (Ferreira, 2019) (Simões, 2021).

Parâmetro	Tipo de lenhina*				
	LS	LK	LH	LOS	L-S
Nível de pureza	Muito alto	Alto	Baixo	Alto	Médio
Solubilidade	Solventes alcalinos	Solventes orgânicos e alcalinos	Parcialmente em solventes orgânicos	Solventes orgânicos	Água
Humidade (%)	2,5-5	3-6	4-9	7,5	5,8
Cinzas (%)	0,7-2,3	0,5-3,0	1,0-3,0	1,7	4,0-9,3
Hidratos de carbono (%)	1,5-3,0	1,0-2,3	10,0-22,4	1-3	-
Azoto (%)	0,2	0,05	0,5-1,4	0-0,3	0,02
Enxofre (%)	0	1,0-3,0	0-1,0	0	3,5-8,0
Peso molecular (g/mol)	1000-3000	1500-5000	5000-10000	500-5000	1000-50000
Vantagens	Não contém azoto; grande pureza	Grande pureza	Produz lenhina com estrutura idêntica à nativa; baixo custo; sem prejuízos ambientais	Grande pureza; baixa quantidade de azoto; preserva a estrutura nativa da lenhina	Boa solubilidade em água
Desvantagens	Difícil de recuperar através de centrifugação ou filtração	Solubilidade fraca	Solubilidade muito fraca	Difícil de produzir em larga escala	Alteração da estrutura da lenhina; baixa pureza após isolamento
Aplicações	Fibras de carbono; vanilina; derivados do fenol	Betume; refinaria; aditivos de cimento; biofuel; carvão ativado; resinas fenólicas; fibras de carbono; vanilina;	Energia; refinaria	Carvão ativado; resinas fenólicas; fibras de carbono; vanilina; derivados do fenol	Refinaria; aditivos de cimento

2.6.3 Nanopartículas de lenhina

Nanopartículas são definidas como partículas de qualquer forma, que apresentem diâmetros até 100 nm, podendo ser estendido para partículas até 500 nm que apresentem propriedades que as diferenciem do material macroscópico. Podem ser compostas por materiais biodegradáveis ou não, com variação de tamanhos dependente do material de origem e do método de obtenção (Vert et al., 2012).

O desenvolvimento de nanopartículas a partir da lenhina é uma alternativa que tem vindo a ser alvo de vários estudos recentemente. A aplicação destas partículas em escala nano apresentam vantagens em relação à utilização apenas da lenhina em vários campos, nomeadamente: proteção UV; pesticidas; fertilizantes; produtos farmacêuticos; adsorção de metais pesados; atividades antioxidantes e antibacterianas; etc. (Figueiredo et al., 2018).

Como referido anteriormente, a valorização da lenhina constitui um desafio na indústria, devido à sua variabilidade, heterogeneidade, cor e baixa reatividade. Desta forma, a sua produção em escala nano contribui para uniformizar a forma e as dimensões das partículas, a partir da formação controlada de agregados macromoleculares com dispersão de tamanhos definida, controlando assim uma das variáveis que limita a aplicação industrial da lenhina como matéria-prima.

Assim, a produção de nanopartículas de lenhina a partir de um subproduto abundante na indústria papeleira (licor negro) é um exemplo de promoção da economia circular, de forma a proporcionar a viabilidade técnica e económica da lenhina. A compreensão dos processos de formação das nanopartículas, a sua caracterização e a aplicação prática dos produtos fornecem informações importantes para a substituição gradual de matérias-primas fósseis por fontes renováveis.

3 Estado da arte

3.1 Métodos de preparação de nanopartículas de lenhina

Estudos recentes sobre nanopartículas de lenhina comprovam a sua preparação a partir de vários métodos: *self-assembly*; troca de solvente através de membranas de diálise; precipitação ácida; polimerização; ultrassom; reticulação e precipitação na presença de CO₂ como anti-solvente.

3.1.1 Método *Self-assembly*

O método de *self-assembly* baseia-se na auto-associação dos constituintes da lenhina, formando espontaneamente estruturas organizadas. As estratégias para a sua utilização geralmente envolvem mudanças nas propriedades hidrofóbicas da lenhina, resultado de alterações físicas ou químicas, como mudanças de temperatura, de força iónica ou o uso de anti-solventes, o que leva à agregação da lenhina. À medida que um solvente no qual a lenhina não se dissolve (normalmente água) é adicionado a uma solução de lenhina, a hidrofobicidade das partículas de lenhina aumenta, devido ao fortalecimento das interações moleculares, resultando numa maior agregação e, reduzindo assim, o tamanho das partículas para a escala nano. Na literatura são encontrados diferentes tipos de preparações via *self-assembly*, originando nanopartículas com diferentes características.

Segundo (Qian et al., 2014a), o método *self-assembly* foi usado para produzir esferas coloidais uniformes a partir de lenhina alcalina quimicamente modificada por acetilação. Após a acetilação, a lenhina foi dissolvida em THF (Tetrahidrofurano), e comprovou-se que as esferas coloidais foram obtidas a partir da gradual associação hidrofóbica das moléculas da lenhina acetilada, induzida pela adição contínua de água à solução. O processo de agregação das moléculas teve início quando foi atingido o valor de 44% de volume de água para uma concentração de lenhina em THF de 1,0 mg/mL, tendo terminado aquando de um volume de água de 67%. Esferas com diâmetros de 110 nm foram obtidas após evaporação rotativa para eliminar o excesso de THF. (Qian et al., 2015), comprovaram também que, com o método *self-assembly*, micelas invertidas de lenhina com diâmetros de 120 nm foram facilmente sintetizadas quando a adição gradual de ciclohexano atingiu os 7% em volume numa solução com concentração de 1 mg/mL de lenhina alcalina em dioxano. Estas foram posteriormente separadas recorrendo a vácuo. O esquema deste processo está representado na Figura 3.1

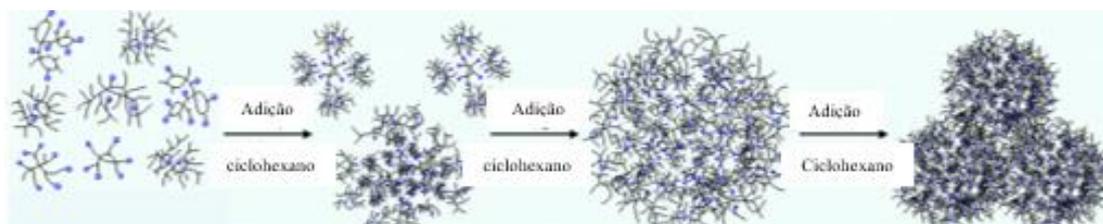


Figura 3.1 – Preparação de nanopartículas de lenhina via *self-assembly* com a adição de ciclohexano. Adaptado de: (Qian et al., 2015).

(Richter et al., 2016), prepararam, via *self-assembly*, nanopartículas de lenhina estáveis e com diâmetros uniformes de 80 nm, a partir de uma solução de lenhina organossolúvel em acetona, com concentração de 5 mg/mL. A 1 mL desta solução foi adicionada gota-a-gota 9,2 mL de água, o que causou a sobressaturação da lenhina, resultando na fase de separação da lenhina na forma de nanopartículas esféricas.

Com o intuito de analisar o efeito que o pH na separação da lenhina do licor negro, tem no tamanho e morfologia das nanopartículas, (Yan et al., 2020) reportaram um método *self-assembly* de fácil execução. Foram preparadas três amostras de lenhina kraft com pH de 6, 4 e 2 pela adição de ácido sulfúrico ao licor negro. Posteriormente, foi acrescentado THF, de modo que a concentração das soluções fosse de 2 mg/mL. De seguida, adicionou-se água ultrapura a uma velocidade de 3 mL/min, de modo a formar nanopartículas esféricas de cada tipo de lenhina. No fim, as suspensões de nanopartículas foram colocadas em membranas de diálise e imersas em água destilada (substituída periodicamente), para remover o excesso de THF. Os resultados mostraram que com menores valores de pH, se observa uma diminuição do tamanho das nanopartículas, com diâmetros de aproximadamente 630 nm, 333 nm e 114 nm da amostra mais alcalina para a mais ácida, respetivamente. Quanto à morfologia, as amostras com pH 6 e 4 mostraram configurações esféricas ocas, mas na amostra de pH 2 visualizaram-se configurações esféricas sólidas. Isto é causado pela diminuição do conteúdo fenólico, pelas grandes interações $\pi - \pi$ entre as partículas e relações hidrofóbicas.

Quanto a lenhinho-sulfonatos, foram realizados alguns estudos de preparação de nanopartículas a partir deste tipo de lenhina, no entanto, devido às suas grandes propriedades hidrofílicas, é difícil formar estruturas com morfologia normal. Deste modo, (Tang et al., 2017) propuseram um método *self-assembly* para tentar eliminar este inconveniente, em que foi adicionado o surfatante catiónico CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio) com o intuito de causar modificações hidrofóbicas nas moléculas de lenhina. Isso acontece, porque como as moléculas deste tipo de lenhina são carregadas negativamente, o CTAB irá fixar-se à sua superfície através de atrações eletrostáticas, formando uma “barreira”, e aumentando assim as propriedades

hidrofóbicas. O método consistiu em adicionar uma solução de lenhinho-sulfonatos a uma solução de CTAB. De seguida, a solução foi dissolvida em etanol para preparar soluções de 1 mg/mL, e posteriormente foi adicionada água a uma taxa de 20 $\mu\text{L/s}$ até o volume desta na solução atingir os 90 %. Os resultados mostraram nanopartículas coloidais de diâmetros aproximadamente de 500 nm. Um esquema deste processo está representado na Figura 3.2.

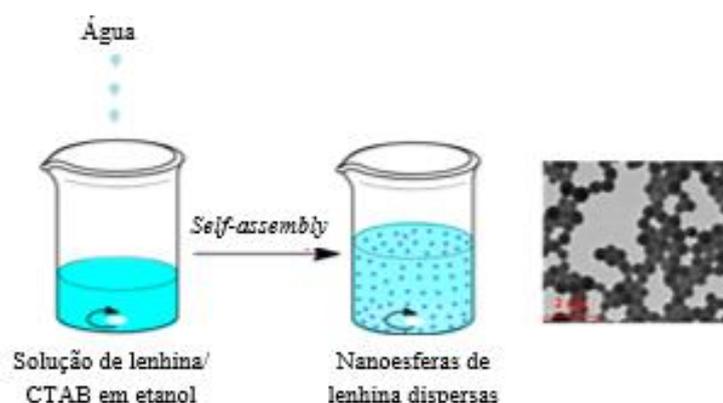


Figura 3.2 - Preparação de nanopartículas de lenhina via *self-assembly* com a adição de água. Adaptado de: (Tang et al., 2017).

3.1.2 Método de troca de solvente com recurso a membranas de diálise

Os métodos que envolvem a troca de solvente através de diálise caracterizam-se pela sua simplicidade e pela não utilização de demasiados químicos. Estes consistem na introdução da solução numa membrana de diálise imersa em água e na substituição gradual do solvente onde a lenhina está dissolvida, pela água em excesso que rodeia a membrana, dando origem à auto-agregação das moléculas da lenhina, formando nanopartículas dispersas em água. Isto ocorre porque o solvente (solúvel em água) irá misturar-se com a água e a lenhina, como é hidrofóbica, irá apenas ficar dispersa na água.

(Lievonen et al., 2016) prepararam nanopartículas esféricas, a partir de um processo que consistiu em dissolver lenhina kraft em THF com várias concentrações (0,1; 1; 2; 5 e 10 mg/ml), para analisar a influência no tamanho das partículas. De seguida, as soluções foram filtradas e introduzidas em membranas de diálise, que foram imersas em água destilada (substituída periodicamente durante 24 horas). As nanopartículas foram formadas durante o processo de diálise, com diâmetros na gama dos 200-500 nm, apresentando o mínimo para a concentração de 1 mg/mL e o máximo para 5 mg/mL. Esta preparação está esquematizada na Figura 3.3.

(Lintinen et al., 2016) sintetizaram nanopartículas com propriedades metálicas a partir de lenhina kraft, onde foram preparadas soluções de $\text{Fe}(\text{OiPr})_3$ em THF, $\text{Fe}(\text{OiPr})_2$ em THF e soluções de lenhina em THF. Estas soluções foram misturadas segundo várias proporções e, após reações de hidrólise, colocadas numa membrana de diálise e imersas em água para a troca de solvente. Foram obtidas nanopartículas sólidas com propriedades metálicas e com diâmetros na gama dos 10-30 nm, e outras de forma esférica com diâmetros na ordem dos 50-400 nm.

Outros estudos de síntese de nanopartículas de lenhina recorrendo a troca de solvente através de diálise com água foram elaborados por (Figueiredo et al., 2017) e por (Zikeli et al., 2019). Neste último, as nanopartículas formadas serviram para um tratamento na superfície de madeira, usando uma técnica de revestimento por imersão.

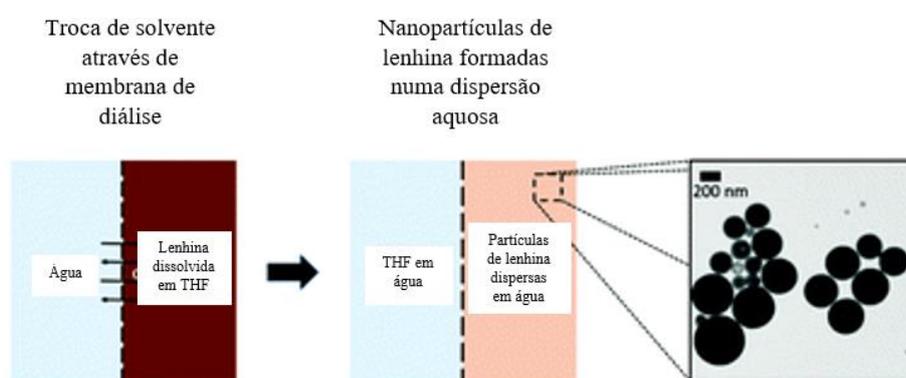


Figura 3.3 – Preparação de nanopartículas de lenhina por de troca de solvente através de membranas de diálise. Adaptado de: (Lievonon et al., 2016).

3.1.3 Método de precipitação ácida

Os métodos de precipitação ácida consistem na mudança do pH da solução inicial para valores mais baixos, o que provoca a precipitação das nanopartículas.

O tamanho das partículas é influenciado pela concentração inicial da lenhina, pelo tipo de solvente utilizado, pela velocidade de adição de ácido e pelo tipo de ácido a ser utilizado, como concluído por (Frangville et al., 2012). Aqui, foram levados a cabo dois procedimentos de precipitação ácida com diferentes características. No primeiro, a uma solução de lenhina alcalina em etilenoglicol, foi adicionado ácido clorídrico (0,025 M) a uma velocidade de 0,04 mL/min e a solução foi sujeita a diálise durante três dias. Esta preparação deu origem a nanopartículas estáveis com diâmetros de 100 nm para as condições ótimas de preparação. No

segundo procedimento, uma solução de lenhina alcalina dissolvida numa solução aquosa de pH 11,44, com a concentração de 83 mg/mL foi colocada em contacto com ácido nítrico (0,025 M) até um pH de 1,97. Isto levou à precipitação de nanopartículas de lenhina, com uma média de tamanhos de 86 nm.

Outros estudos foram realizados segundo metodologias similares à de (Frangville et al., 2012) com base na precipitação ácida, introduzindo outras variáveis à sua preparação, como a adição de um surfatante, ilustrado na Figura 3.4 (Pang et al., 2017).

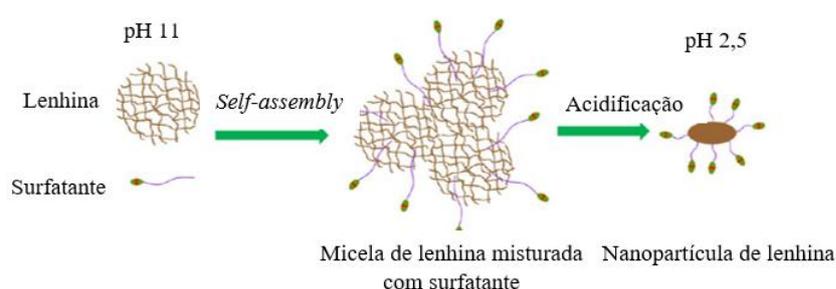


Figura 3.4 – Preparação de nanopartículas de lenhina por precipitação ácida. Adaptado de: (Pang et al., 2017).

O mesmo procedimento, elaborado por (Rahman et al., 2018), foi aplicado com diferentes solventes: água; etilenoglicol e óleo de castor, a partir dos quais se obtiveram nanopartículas esféricas de lenhina, com tamanhos de aproximadamente 100 nm; 20-30 nm e 15-20 nm, respetivamente. A lenhina de palha de arroz foi dissolvida em cada um dos solventes, na concentração de 20 % (m/m). De seguida, 20 mL de ácido clorídrico (1 M) foi adicionado lentamente à mistura numa atmosfera de azoto, tendo permanecido sob agitação durante 4 horas, a 50 °C. No fim, as nanopartículas sintetizadas foram lavadas com água e etanol até o pH de 7 ser atingido.

3.1.4 Método de polimerização

Os métodos de polimerização, ao contrário dos métodos já referidos neste capítulo, apresentam uma difícil execução, em que são envolvidos muitos químicos, pelo que não são métodos muito vantajosos. Os métodos de polimerização consistem na ligação de monómeros através de reações químicas que levam à formação de polímeros.

No estudo apresentado por (Barakat et al., 2007), foram sintetizadas nanopartículas de diâmetros aproximadamente entre 25-70 nm, a partir de um polímero sintético da lenhina, o “arabinoxylan dehydrogenation polymer”. Neste processo foram polimerizados álcool coniferílico e álcool sinapílico (precursores da lenhina) na presença de heteroxilanas para preparar as nanopartículas do “arabinoxylan dehydrogenation polymer”.

(Qian et al., 2014b), desenvolveram um método de polimerização, no qual foram obtidas nanopartículas com diâmetros entre os 237 nm e os 404 nm. O método consistiu em modificar quimicamente a lenhina alcalina através da polimerização radicalar por transferência de átomos, ao inserir 2-(dietil-amino)etil metacrilato na lenhina, por diversas reações químicas.

3.1.5 Método de ultrassom

Apesar das desvantagens que grandes distribuições de tamanhos de nanopartículas acarretam, o método de ultrassom, assim como outros tratamentos mecânicos, continuam a ser dos mais utilizados para reduzir o tamanho das partículas para a escala nano, devido à sua simplicidade.

Um exemplo de preparação de nanopartículas de lenhina por ultrassom foi apresentado por (Gilca et al., 2015), onde foi utilizado dois tipos de lenhina: lenhina de palha de trigo e lenhina obtida a partir de relva. Suspensões aquosas com concentração de lenhina de 0,7% foram sonicadas por 60 minutos, a uma potência de 600 W, até à obtenção de uma dispersão homogênea de partículas em escala nano. Depois de secagem, observaram-se partículas com tamanhos entre os 10-50 nm, apesar de apresentarem morfologias ligeiramente irregulares.

Uma tentativa de melhoramento das propriedades de protetores solares foi apresentada por (Zhou et al., 2020), ao prepararam nanocápsulas de lenhina incorporada em dopamina, a partir de um procedimento experimental que se baseou, inicialmente, na sua dissolução numa solução alcalina até uma concentração de 10 % (m/m). Uma mistura de metoxicinamato de octilo (OMC) com avobenzona (BMDM) e polisorbato 80 foram adicionados à solução e esta mistura foi sonicada por 3 minutos, a uma potência de 600 W. As nanocápsulas esféricas, com diâmetros na gama dos 180-243 nm, foram obtidas após 30 minutos de centrifugação e 3 lavagens.

3.1.6 Método de reticulação

Os métodos de reticulação ocorrem quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes, ou seja, ligações entre moléculas lineares que produzem polímeros tridimensionais com alta massa molar.

(Yiamsawas et al., 2014), desenvolveu um processo de reticulação para preparação de nanopartículas de lenhina com lenhina alcalina e lenhinho-sulfonatos. O método consistiu em dissolver, previamente, a lenhina em soluções aquosas de cloreto de sódio, sendo posteriormente misturada com ciclohexano que continha o surfatante polirricinoleato de poliglicerol (PGPR). Seguiu-se uma etapa de sonicação, e a reação de reticulação ocorreu ao adicionar, gota-a-gota, uma solução de diisocianato de tolueno (TDI) em ciclohexano. Depois da emulsão preparada ter repousado durante a noite, à temperatura ambiente, as nanocápsulas de lenhina foram formadas com sucesso. As partículas de formas ocas e irregulares obtidas por este processo apresentaram tamanhos de 150-200 nm, tanto para a lenhina alcalina, como para lenhinho-sulfonatos.

Outra perspectiva de reticulação encontra-se descrita no estudo realizado por (Li et al., 2015), em que o agente de reticulação neste caso foi epícloridrina. Para a síntese de esferas com tamanho aproximado de 20,7 nm, começou-se por misturar 5 mL de uma solução de lenhinho-sulfonatos com concentração de 10 mg/mL, 1 mL de epícloridrina e 20 mL de hidróxido de sódio (0,2 M) numa solução de alginato de sódio (NaCHO) com concentração de 2,0 % (m/v). A mistura foi agitada durante 12 horas, a 60 °C. Depois da reação de reticulação ter terminado, a mistura foi envolvida numa solução de cloreto de cálcio (0,1 M), a 80 °C, para congelamento total das esferas, durante a noite. Por fim, as nanopartículas de lenhina esféricas foram obtidas através de filtração, lavagem e secagem. A preparação está esquematizada na Figura 3.5.

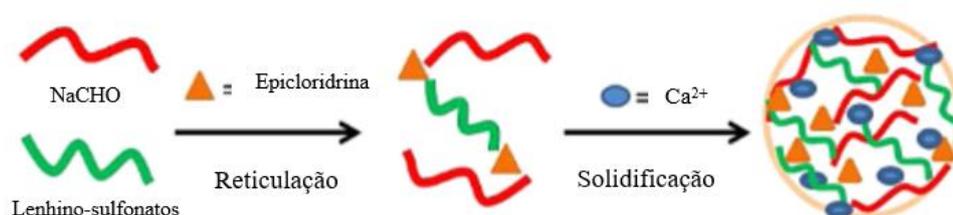


Figura 3.5 – Exemplo de preparação de nanopartículas de lenhina por reticulação. Adaptado de: (Li et al., 2015).

3.1.7 Método baseado em CO₂ como anti-solvente

A utilização de CO₂ como um anti-solvente para produzir nanopartículas tem atraído especial interesse, devido às suas vantagens, como a sua abundância; baixo custo; não é tóxico; não é inflamável e não apresenta grande solubilidade para macromoléculas (Beisl et al., 2017). Um esquema deste processo encontra-se na Figura 3.6 abaixo representada.

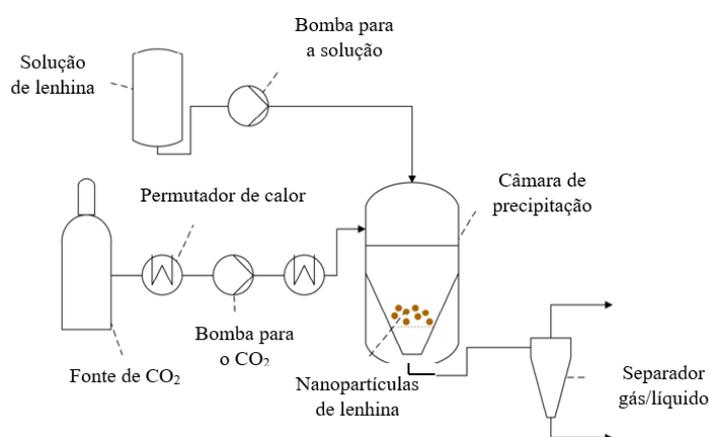


Figura 3.6 – Preparação de nanopartículas de lenhina por precipitação na presença de CO₂ como anti-solvente. Adaptado de: (Beisl et al., 2017).

No estudo desenvolvido por (Lu, et al., 2012), o procedimento experimental iniciou-se com o preenchimento da câmara de precipitação com CO₂ a um caudal de 8,0 kg/h, para uma pressão de 30 MPa, a 35 °C. Lenhina organossolúvel foi totalmente dissolvida em acetona, tendo esta alcançado uma concentração de 0,5 mg/mL. De seguida, a solução foi introduzida na câmara através de uma bomba peristáltica, a uma velocidade de 6,5 mL/min. Quando a solução foi totalmente introduzida na câmara de precipitação, a bomba peristáltica foi parada. O CO₂ continuou a ser injetado para dentro da câmara por mais 30 minutos para remover totalmente os resíduos orgânicos do solvente. Finalmente, quando a pressão da câmara diminuiu gradualmente até à pressão atmosférica, as nanopartículas de lenhina foram retiradas. Este procedimento originou partículas esféricas, com tamanhos de aproximadamente 144 nm.

Um outro procedimento experimental em que o CO₂ foi utilizado como anti-solvente foi apresentado por (Myint et al., 2016). Neste, entre outras variáveis, foi também avaliada a influência da concentração de lenhina no tamanho das nanopartículas sintetizadas, portanto, foram preparadas soluções de lenhina com concentrações entre 5,3 e 15 % (m/m) ao dissolver a lenhina alcalina em dimetilformamida (DMF). Estas foram sonicadas por 30 minutos à temperatura ambiente. O CO₂ foi introduzido no precipitador através de uma bomba, até serem atingidas condições de pressão e temperatura estáveis, e só depois é que a solução de lenhina foi pulverizada no precipitador. As nanopartículas de forma quase esférica e com tamanhos na gama dos 38-54,5 nm, foram obtidas no papel de filtro, enquanto o CO₂ continuou a ser injetado no precipitador por mais 30 minutos para remover qualquer quantidade de solvente ainda retido nas nanopartículas. Por fim, a pressão do precipitador e do filtro foi reduzida.

3.2 Aplicações das nanopartículas de lenhina

3.2.1 Aplicações farmacêuticas e agrícolas

Um grande número de estudos científicos demonstra que as nanopartículas de lenhina têm capacidade para encapsular diferentes compostos que podem ser úteis para várias aplicações farmacêuticas e em atividades agrícolas.

(Qian et al., 2014a), sintetizaram esferas coloidais com a lenhina acetilada misturada em THF, a partir de um método *self-assembly*, em que se demonstrou a aplicabilidade destas partículas no encapsulamento de pesticidas, formando assim complexos mais solúveis e, eventualmente, mais estáveis quimicamente, garantindo uma redução dos efeitos dos pesticidas no meio ambiente. Demonstrou-se também potenciais aplicações a níveis farmacêuticos.

(Deng et al., 2016), utilizaram as partículas ocas de lenhina que obtiveram pelo método *self-assembly* para encapsular o pesticida avermectina (AVM). Os resultados mostraram que estas esferas ocas coloidais têm uma forte eficiência no encapsulamento deste pesticida, com o valor de 61,49 % (m/m). Esta cápsula, devido às suas propriedades de proteção UV, poderá evitar a fotodegradação do pesticida. Outra vantagem desta aplicação foi a libertação controlada da AVM, no qual, ao fim de 120 horas, a quantidade cumulativa de AVM libertada foi de 84 %. Um estudo idêntico realizado por (Li et al., 2017a), mas com outro tipo de lenhina e solvente, demonstrou igualmente uma forte eficiência do encapsulamento de avermectina, com o valor de 62,58 %. Aqui, após 70 horas, a quantidade cumulativa de AVM libertada foi de 49,96 %.

As partículas sintetizadas por (Figueiredo et al., 2017), são candidatas à aplicação na terapia e diagnóstico do cancro, bem como na utilização em imagens de ressonância magnética, devido ao seu comportamento superparamagnético, baixa citotoxicidade e boa interação celular demonstrados.

De forma idêntica, no estudo elaborado por (Dai et al., 2017), as nanopartículas preparadas por *self-assembly* podem ser apresentadas como um veículo estável de fármacos. Em testes citológicos e em animais, estas partículas demonstraram bons efeitos contra o cancro e melhorias na redução de tumores, apresentando também menos efeitos adversos que os fármacos habituais, o que suporta a aplicação de nanopartículas de lenhina como uma eficiente forma de introdução de novos medicamentos.

(Li et al., 2017), prepararam micelas complexas dependentes do pH a partir de lenhina alcalina e dodecilbenzenossulfonato de sódio (SDBS) em solventes verdes, para encapsular o medicamento ibuprofeno através de interações hidrofóbicas. A eficiência de encapsulamento foi calculada em 74,44 % e testes *in vitro* demonstraram a sua dependência do pH e libertação

controlada do ibuprofeno. Este estudo apresentou uma nova abordagem de produção de novos veículos de medicamentos orais.

3.2.2 Absorventes UV

A lenhina tem um excelente potencial de absorção das radiações ultravioleta, devido à sua grande resistência oxidativa, tal como demonstrado por diversos estudos científicos.

Um desses estudos foi desenvolvido por (Qian et al., 2015), onde foram preparadas micelas invertidas de lenhina via *self-assembly*. Quando a lenhina foi transformada em esferas coloidais invertidas, as propriedades hidrofóbicas aumentaram, o que resultou numa melhor mistura das micelas em polietileno de alta densidade. Os materiais resultantes desta incorporação mostraram excelentes propriedades de absorção UV, por causa dos compostos fenólicos ainda retidos nas partículas de lenhina. O mesmo estudo produziu também três tipos de esferas coloidais de lenhina normal com tamanhos diferentes e incorporou-as em cremes para a pele, com o intuito de desenvolver protetores solares à base de lenhina. Os resultados indicaram que o desempenho dos cremes em termos de proteção solar foi maior nos que continham esferas coloidais de lenhina normal, e que o tamanho destas influencia o desempenho, que diminui para partículas maiores. De forma semelhante, (Wang et al., 2018) preparou nanopartículas de lenhina ao, inicialmente, modificar a lenhina por um processo de acetilação, sendo que as nanopartículas foram formadas quando sujeitas a um processo de troca de solvente combinado com ultrassom. Estas nanopartículas foram adicionadas a cremes para a pele, tendo resultado num melhoramento das propriedades de proteção solar. Foi também demonstrado que partículas com tamanhos mais pequenos são mais eficientes em termos de absorção UV.

Outra aplicação foi apresentada por (Zikeli et al., 2019), ao utilizar nanopartículas de lenhina para tratamento da superfície da madeira, através de uma técnica de revestimento por imersão. Os resultados mostraram que as nanopartículas sintetizadas a partir de lenhina podiam aumentar a resistência da madeira a radiações UV, pela presença de compostos aromáticos.

3.2.3 Nanocompostos híbridos

Compostos híbridos são materiais que apresentam propriedades físicas e químicas diferentes das exibidas pelos respetivos materiais individuais. As nanopartículas de lenhina são frequentemente misturadas com polímeros como agentes de reforço, o que faz com que os copolímeros obtidos apresentem melhores propriedades mecânicas, térmicas e biocompatíveis do que os polímeros originais.

(Chung et al., 2013) transformou lenhina num copolímero derivado de ácido láctico (PLA), ao inserir moléculas de ácido láctico na lenhina, usando triazabiciclododeceno (TBD) como catalisador e como forma de melhorar a sua miscibilidade noutros bioplásticos. O comprimento da cadeia de PLA pode ser ajustada por tratamentos de acetilação prévios ou ao alterar as quantidades de lenhina e das moléculas do ácido láctico. Quando 10 % destes copolímeros foram adicionados, tanto as propriedades de absorção UV, como as propriedades mecânicas dos compostos de PLA foram melhoradas.

Outro exemplo de aplicação das nanopartículas de lenhina foi desenvolvido por (Jiang et al., 2013), onde as nanopartículas preparadas por *self-assembly* foram misturadas com latex de borracha natural, tendo resultado numa melhoria das propriedades mecânicas e da estabilidade térmica deste novo composto.

(Gupta et al., 2015) adicionou 1,5 % (m/m) das nanopartículas resultantes da precipitação ácida a bio poli(trimetileno tereftalato) (bio-PTT), e os resultados mostraram que a resistência à tração, flexibilidade e força de impacto melhoraram em 14,86 %; 14,89 % e 30,93 %, respetivamente, e houve um aumento da temperatura de deflexão térmica de 117,7 % em comparação com o composto sem as nanopartículas de lenhina. Isto indica um excelente efeito das partículas de lenhina no melhoramento de propriedades mecânicas e resistência térmica do bio-PTT. Este estudo mostrou também que o composto formado apresenta uma grande capacidade de absorção de água.

3.2.4 Agentes antioxidantes

Antioxidantes são substâncias moleculares ou nanomateriais que, quando adicionadas a substâncias oxidáveis, as protegem por redução ou inibição da auto-oxidação (Valgimigli et al., 2018).

Os grupos funcionais como os grupos metóxilos e os grupos fenólicos da lenhina são capazes de acabar com a propagação de reações de oxidação, através da transferência de hidrogénio (Figueiredo et al., 2018) (Gao e Fatehi, 2019). Desta forma, nanopartículas de lenhina podem ser introduzidas em diversos materiais com o objetivo de produzir produtos antioxidantes.

No estudo de (Lu et al., 2012), devido à crescente solubilidade em água, as nanopartículas de lenhina preparadas pelo método de CO₂ como anti-solvente, apresentaram grande atividade antioxidante, ao exibirem uma grande capacidade de eliminação/inibição dos radicais superóxido e DPPH.

Segundo os resultados de (Ge et al., 2014), as nanopartículas sintetizadas por precipitação apresentaram uma maior atividade contra radicais livres do que a amostra de controlo e, de

acordo com o método de DPPH, o valor de IC50 diminuiu para as partículas de escala nano, comparativamente às de escala micro, confirmando assim, uma maior atividade antioxidante para partículas de lenhina em escala nano.

Uma outra abordagem encontra-se descrita no artigo desenvolvido por (Yearla e Padmasree, 2015). Neste, foram produzidos dois tipos de nanopartículas de lenhina alcalina e de nanopartículas de lenhina em dioxano. Comparando os polímeros originais da lenhina alcalina e da lenhina em dioxano, ambas as nanopartículas preparadas a partir destes têm maior atividade antioxidante, de acordo com a análise da capacidade de eliminação de radicais livres. Para além disso, verificou-se que as nanopartículas de lenhina em dioxano apresentam maior proteção UV para a bactéria *Escherichia coli* do que as nanopartículas de lenhina alcalina. Tendo em conta as boas propriedades antioxidantes e a proteção UV demonstrada, estas nanopartículas poderão ser aplicadas nas indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética.

3.2.5 Outras aplicações

Para além das aplicações descritas anteriormente, as nanopartículas de lenhina têm também vindo a ser exploradas para outras aplicações industriais, como agentes antibacterianos; adsorventes para remover iões de metais pesados e agentes anticorrosivos.

A presença de compostos fenólicos influencia a atividade antibacteriana da lenhina, o que faz com que esta possa ser utilizada como um agente antibacteriano. (Kim et al., 2013) desenvolveram nanopartículas combinando lenhino-sulfonatos com quitosana, cujo composto obtido demonstrou maior poder antibacteriano do que nanopartículas de quitosana sozinhas.

Por outro lado, a lenhina pode também atuar como um adsorvente para remover iões de metais pesados e corantes. (Li et al., 2015) utilizaram as esferas porosas de lenhino-sulfonatos obtidas para adsorver iões de chumbo. Estas esferas possuíam um volume total de poros de 0,416 cm³/g e porosidade de 87,66 %, proporcionando assim características para poderem ser aplicadas em tratamentos de águas residuais ricas em metais pesados.

Por fim, outra aplicação para nanopartículas de lenhina foi estudada por (Rahman et al., 2018), na qual foi avaliado o poder anticorrosivo de três tipos de nanopartículas de lenhina, via precipitação ácida em meios diferentes. Os resultados mostraram que os três tipos de nanopartículas poderiam ser aplicados em matrizes de epóxi, formando nanocompostos para revestimentos para proteger elementos de aço de corrosão em ambientes salinos.

No Quadro 3.1 encontra-se o levantamento dos métodos de preparação de nanopartículas acima descritos, algumas características e a respetiva aplicação destas.

Quadro 3.1 – Revisão de algumas publicações relativas a diferentes métodos de preparação de nanopartículas de lenhina e respetiva aplicação.

Método	Lenhina	Concentração	Tamanho (nm)	Forma	Solvente	Aplicação	Ref ^a
<i>Self-assembly</i>	Kraft	1 mg/mL	110	Esferas coloidais	THF	Fonte de biomassa	(Qian et al., 2014a)
<i>Self-assembly</i>	Kraft	1 mg/mL	120	Micelas invertidas	Ciclohexano	Proteção UV em termoplásticos	(Qian et al., 2015)
<i>Self-assembly</i>	Organossolve	5 mg/mL	80	Esferas	Acetona	Pesticidas; antibacterianos	(Richter et al., 2016)
<i>Self-assembly</i>	Kraft	2 mg/mL	630 (pH 6); 333 (pH 4); 114 (pH 2)	Esferas ocas (pH 4 e 6); Esferas sólidas (pH 2)	THF	Proteção UV; adsorventes (esferas sólidas); medicamentos (esferas ocas)	(Yan et al., 2020)
<i>Self-assembly</i>	Lenhino-sulfonatos	1 mg/mL	500	Esferas coloidais	Etanol	Proteção UV; pesticidas	(Tang et al., 2017)
Troca de solvente	Kraft	0,1-10 mg/mL	200-500	Esferas	THF	Colas; compostos; medicamentos; antibacterianos	(Lievonon et al., 2016)
Troca de solvente	Kraft		10-30	Pequenas partículas sólidas	THF	Magnetismo; antibacterianos; catalíticos	(Lintinen et al., 2016)
	Kraft		50-400	Esferas grandes e uniformes			
Precipitação ácida	Kraft	5,6 mg/mL	100	Aglomerados densos	Etilenoglicol	Cosméticos e adsorventes de metais pesados	(Frangville et al., 2012)
	Kraft	83 mg/mL	86		Água alcalina		

Quadro 3.1 (conclusão) – Revisão de algumas publicações relativas a diferentes métodos de preparação de nanopartículas de lenhina e respetiva aplicação.

Precipitação ácida	Lenhina de palha de arroz (SERSL)	20 % (m/m)	100 (água); 20-30 (etilenoglicol); 15-20 (óleo)	Esferas	Água; etilenoglicol; óleo de castor	Anti-corrosão	(Rahman et al., 2018)
Polimerização	“Arabinoxylan - dehydrogenation polymer”		25-70	Esferas	Álcool sináplico; álcool coniferílico	Produtos à base de plantas; compostos biodegradáveis	(Barakat et al., 2007)
Polimerização	Kraft		237-404			Surfactantes para emulsões de Pickering de CO ₂ /N ₂	(Qian et al., 2014b)
Ultrassom	Lenhina de palha de trigo	0,7 % (m/m)	10-50	Esferas irregulares	Água	Tratamentos de fibras têxteis	(Gilca et al., 2015)
Ultrassom	Lenhina de relva Kraft	10 % (m/m)	180-243	Esferas	Solução alcalina	Proteção UV	(Zhou et al., 2020)
Reticulação	Lenhino-sulfonatos Kraft		150-200	Estruturas irregulares e ocas	Ciclohexano	Pesticidas; medicamentos; fertilizantes	(Yiamsawas et al., 2014)
Reticulação	Lenhino-sulfonatos organossolve	10 mg/mL	20,7	Esferas	Água destilada	Adsorção de metais pesados	(Li et al., 2015)
CO₂ como anti-solvente		0,5 mg/mL	144	Esferas	Acetona	Indústria farmacêutica e alimentar	(Lu et al., 2012)
CO₂ como anti-solvente	Kraft	5,3-15 % (m/m)	38-54,5	Esferas	DMF	Cosméticos; medicamentos	(Myint et al., 2016)

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

No Quadro 4.1 apresentam-se todos os reagentes químicos utilizados, com a respetiva fórmula química e fornecedor. É importante ter em consideração os riscos e segurança de cada um.

Quadro 4.1 – Reagentes utilizados, fórmula química e respetivo fornecedor.

Nome	Fórmula química	Fornecedor
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Honeywell
Etilenoglicol	C ₂ H ₆ O ₂	-
Ácido Clorídrico	HCl	Honeywell
Hidróxido de sódio	NaOH	JMGS
Dodecilsulfato de sódio	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Sigma-Aldrich
Anilina	C ₆ H ₅ NH ₂	Acros Organics
Nitrito de sódio	NaNO ₂	Honeywell
Peróxido de hidrogénio	H ₂ O ₂	Labkem
Metanol	CH ₃ OH	Sigma-Aldrich
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Honeywell
Dodecilbenzenossulfonato de Sódio	C ₁₆ H ₂₆ SO ₃	Sigma-Aldrich
2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	TCI

4.1.2 Lenhina comercial

Neste trabalho foi utilizada lenhina fornecida pelo RAIZ (Instituto da investigação da Floresta e do Papel), isolada a partir do processo LignoBoost, com teor de cinzas inferior ou igual a 1%.

4.1.3 Membranas de diálise

As membranas de diálise utilizadas neste trabalho foram as do tipo SpectraPor® 1, com diâmetro de 25,5 mm e corte molecular (*cut-off*) de 6-8 kDa, fornecidas pelo SpectrumLabs.

4.2 Métodos de preparação de nanopartículas de lenhina

4.2.1 *Self-assembly*

Foram realizados dois procedimentos experimentais com base no método *self-assembly*, de acordo com a literatura, tendo sido feitas ligeiras alterações em algumas partes.

No primeiro processo, 1,226 g de lenhina foram adicionados a 50 mL de etanol e, posteriormente, colocou-se a mistura em banho de ultrassons por 5 minutos para facilitar a sua dissolução. Com o objetivo de dissolver a maior quantidade de lenhina possível, deixou-se em repouso durante 72 horas. Os componentes insolúveis remanescentes foram separados por centrifugação durante 15 minutos e a lenhina insolúvel em etanol foi separada destes por secagem na estufa a 60 °C durante dois dias, tendo sido posteriormente pesada (1,191 g). Por outro lado, o sobrenadante obtido na centrifugação foi sujeito a evaporação rotativa, para obter a quantidade de lenhina solúvel em etanol (0,041 g). O etanol recuperado nesta fase foi guardado para futuras utilizações.

À lenhina solúvel foi adicionando etanol até a solução ficar com a concentração de 2,285 mg/mL. A partir desta, foram realizadas sucessivas diluições e medidas as absorvâncias num espectrofotómetro UV/Vis, sendo que a curva de calibração está apresentada no Anexo A. De seguida, a 3 mL da solução inicial foi adicionada água destilada, gota a gota, com a ajuda de uma bomba peristáltica, até o conteúdo desta na solução ter alcançado os 90%. Para estudar a influência da velocidade de gotejamento da água destilada no tamanho e morfologia de nanopartículas produzidas efetuaram-se três ensaios com diferentes velocidades: 0,023 mL/s; 0,054 mL/s e 0,081 mL/s (Li et al., 2016).

No segundo processo, 0,90 g de lenhina foram dissolvidos em 100 mL de uma solução de NaOH (pH = 12) e a mistura foi aquecida até aos 90 °C numa placa de aquecimento e agitação a 100 rpm. Adicionou-se gota a gota 0,16 g de peróxido de hidrogénio (30%), tendo estado durante 1 hora no agitador. Neste momento, 0,37 g de anilina foram dissolvidos em ácido sulfúrico, à temperatura de 0 °C, para ser incorporada numa solução de 2,5 mL de nitrito de sódio (17,60 mmol), tendo estado sob agitação durante 1 hora. As duas misturas preparadas foram misturadas durante 1 hora, à temperatura de 0 °C, e a reação ocorreu quando o pH da solução foi ajustado para 9,98 devido à junção de hidróxido de sódio (0,10 M). Os produtos foram precipitados ao ajustar o pH até 2,70 aquando da adição de ácido sulfúrico (0,1 M). Por fim, os precipitados foram sujeitos a uma lavagem com água destilada por três vezes na centrífuga, para remover os iões e as aminas aromáticas que não reagiram (Deng et al., 2016).

4.2.2 Precipitação ácida

Foram realizados três procedimentos experimentais com base no método da precipitação ácida de acordo com a literatura, tendo sido feitas ligeiras alterações em algumas etapas.

No primeiro processo, 2,5 g de lenhina foram adicionados a 50 mL de etilenoglicol, e sujeito a agitação durante 1 hora para homogeneizar os componentes. Colocou-se a solução num balão de 3 tubuladuras e aqueceu-se até à temperatura de 50 °C numa placa de aquecimento. De seguida, 10 mL de ácido clorídrico foram adicionados gota a gota sob uma atmosfera de azoto e a agitação continuou durante 4 horas à mesma temperatura. As nanopartículas sintetizadas foram sujeitas a dois ciclos de lavagens com recurso à centrifuga, primeiramente com etanol e depois com água até o pH destas alcançar o valor de 7 (Rahman et al., 2018).

Num segundo processo, 1,4 g de lenhina foram dissolvidas em 250 mL de etilenoglicol através de agitação durante 6 horas à temperatura ambiente, a fim de obter uma solução com a concentração de 2,8 % (m/m). Esta foi filtrada para remover as impurezas insolúveis da lenhina. De seguida, uma solução de ácido clorídrico (0,025 M) foi adicionada a 90 mL da solução de lenhina, a uma taxa de 0,5 mL/min até ser alcançado o pH de 2. O precipitado foi sujeito a três ciclos de lavagem com água destilada através de centrifugação e, posteriormente, a parte sólida foi colocada na estufa de secagem, tendo resultado em 0,0113 g (Gupta et al., 2015).

No terceiro processo de precipitação ácida, 1 g de lenhina foi misturado com 100 mL de água destilada. Com a finalidade de aumentar o pH da solução para 11, adicionou-se hidróxido de sódio (5 M), tendo ficado sob agitação durante a noite para dissolver o máximo possível de lenhina. Na manhã seguinte, a solução foi filtrada para remover quaisquer impurezas. De seguida, distribuiu-se a solução por 4 gobelés, e adicionou-se dodecilsulfato de sódio (SDS) em quantidades que levam a concentrações deste na solução final de 0 mM; 4 mM; 8 mM e 12 mM, respetivamente, deixando sob agitação por 30 minutos. Posteriormente, o pH das soluções foi ajustado até ao valor de 2,5 através da adição de ácido clorídrico (1 M). Depois destas terem ficado durante a noite sob agitação para remover alguns sais inorgânicos, como cloreto de sódio, foram introduzidas em membranas de diálise e imersas em 5 L de água destilada, periodicamente substituída durante 5 dias (Pang et al., 2017).

Após a realização dos diferentes procedimentos acima descritos e depois de analisar algumas propriedades das nanopartículas obtidas, houve a necessidade da elaboração de um método simples, rápido e que não envolvesse uma grande quantidade de reagentes. Este encontra-se explicitado na secção 4.3.1, tendo por base a precipitação ácida como mecanismo de formação das nanopartículas.

4.3 Otimização das propriedades das nanopartículas

O efeito da concentração de lenhina, do pH e da concentração de surfatante nas propriedades das nanopartículas foi estudado recorrendo ao software JMP® Pro 16 para determinar as melhores condições de operação.

O efeito dos três fatores (concentração de lenhina; pH e concentração de surfatante) no tamanho e no conteúdo fenólico das nanopartículas foi analisado de acordo com o planeamento fatorial completo de experiências (DOE) de três fatores a 2 níveis (2^3 experiências), com duas experiências adicionais, considerando os níveis dos fatores no ponto central, como apresentado no Quadro 4.2. Realizaram-se, portanto, dez experiências em que se fizeram variar estes fatores, como apresentado no Quadro 4.3. As concentrações de lenhina foram: 5 mg/mL; 20 mg/mL e 35 mg/mL. Os valores de pH foram: 2; 3,5 e 5. As concentrações de surfatante foram calculadas tendo por base as concentrações de lenhina acima apresentadas: 1 % (m/v lenhina); 5,5 % (m/v lenhina) e 10 % (m/v lenhina), respetivamente.

Quadro 4.2 – Fatores e níveis usados para a otimização do planeamento experimental.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de lenhina (mg/ml)	5	20	35
pH	2	3,5	5
Concentração de surfatante (% m/v lenhina)	1	5,5	10

4.3.1 Método experimental para otimização das propriedades das nanopartículas

Na primeira combinação de variáveis, 2,975 g de lenhina foram misturados durante 1 hora, a 35 °C, em 85 mL de água destilada, para se obter uma solução de lenhina com concentração de 35 mg/mL. Para dissolver a lenhina, adicionou-se hidróxido de sódio (5 M) até ser alcançado o pH de 11 e deixou-se sob agitação durante 30 minutos. A 20 mL desta solução foi adicionada 70 mg de dodecilbenzenossulfonato (o surfatante utilizado nos dez ensaios), para se obter uma concentração de surfatante de 10% da concentração de lenhina. A adsorção do surfatante às moléculas de lenhina causa uma menor dispersão da lenhina formando, via *self-assembly*, agregados moleculares compostos por estes dois elementos. Posteriormente, juntou-se ácido clorídrico (0,5 M) a uma taxa de 2 gotas por minuto até ao pH de 5, para precipitar os agregados

formados. A redução de pH causa uma redução da repulsão eletrostática e, juntamente com as interações hidrofóbicas e forças intermoleculares, conduz à contração destes agregados, reduzindo o seu tamanho para nanopartículas (Pang et al., 2017). Depois desta ter ficado sob agitação durante 1 hora, foi introduzida numa membrana de diálise e imersa em 5 L de água destilada, periodicamente substituída durante 3 dias, com o intuito de remover o excesso de químicos e surfatante presentes na preparação.

Nas restantes nove experiências, o procedimento foi exatamente o mesmo, com as devidas alterações à concentração de lenhina; pH e concentração de surfatante. As diferentes combinações estão apresentadas no Quadro 4.3 e um esquema do procedimento está representado na Figura 4.1.

Quadro 4.3 – Condições experimentais da preparação de nanopartículas.

Nº da experiência	Concentração de lenhina (mg/ml)	Concentração de surfatante (% m/v lenhina)	pH
1	35	10	5
2	5	10	2
3	20	5,5	3,5
4	5	10	5
5	5	1	5
6	35	1	5
7	5	1	2
8	35	1	2
9	20	5,5	3,5
10	35	10	2

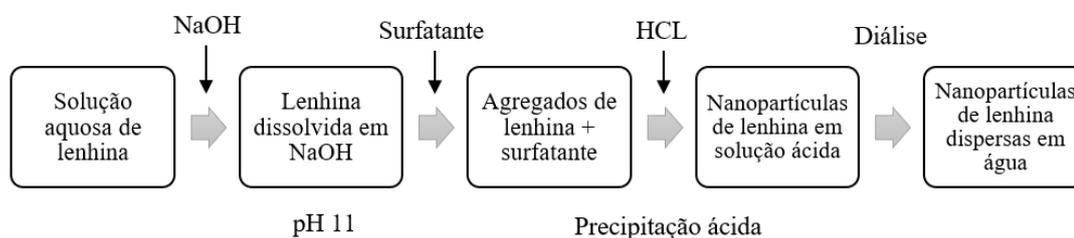


Figura 4.1 – Procedimento experimental utilizado no estudo da otimização das propriedades das nanopartículas.

4.4 Efeito da adição de surfatante nas nanopartículas

Com o intuito de avaliar efetivamente o benefício da adição de surfatante no tamanho, estabilidade e conteúdo fenólico das nanopartículas, foram realizados mais 6 ensaios para as mesmas condições experimentais de três das experiências realizadas no ponto acima, em que numa se adicionou surfatante, desta vez após a diálise, e na outra não. Estas particularidades estão apresentadas no Quadro 4.4.

Quadro 4.4 – Condições experimentais para análise do efeito da presença de surfatante.

Nº da experiência	Concentração de lenhina (mg/ml)	Concentração de surfatante (% m/v lenhina)	pH
1	35	10	5
1 a	35	0	5
3	20	5,5	3,5
3 a	20	0	3,5
4	5	10	5
4 a	5	0	5

a- Experiências em que não é adicionado surfatante.

4.5 Caracterização das nanopartículas de lenhina

4.5.1 SEM (Microscopia eletrónica de varrimento)

A técnica SEM foi utilizada para observar as nanopartículas preparadas, bem como a sua morfologia. Para tal, foi necessário a aplicação de uma fina camada de ouro, evitando contaminações exteriores e destruição das amostras aquando da análise. As imagens SEM do equipamento analítico VEGA3 TESCAN, a uma velocidade de 20 kV, com uma ampliação de 50 kx e em condições de vácuo, foram obtidas no Departamento de Física da Universidade de Coimbra. As imagens SEM do equipamento MAIA3 TESCAN, a uma velocidade de 3 kV e ampliações de 6,15 kx e 13,8 kx foram obtidas na Mid Sweden University, na Suécia.

4.5.2 TEM (Microscopia eletrónica de transmissão)

Como complemento à técnica SEM, foi também utilizada a técnica TEM, igualmente com o intuito de observar as nanopartículas preparadas e a sua morfologia. Aqui, 5 μL de cada amostra foram colocados em grelhas de cobre (300 mesh) e deixadas a adsorver. O excesso foi retirado com papel de filtro. As amostras foram posteriormente visualizadas num microscópio eletrónico de transmissão - FEI Tecnai G2 Spirit BioTwim - a 100 kV, no AIBILI (Associação para Investigação Biomédica em Luz e Imagem).

4.5.3 DLS (Dynamic Light Scattering)

O tamanho das nanopartículas e a sua distribuição foram medidas a 25 °C, a partir do processo DLS (Dynamic Light Scattering), num equipamento chamado Zetasizer, do tipo Nano ZS, cujo fornecedor foi a Malvern Instruments. As amostras foram analisadas em cuvetes de quartzo, sujeitas à ação de um laser usado para iluminar as partículas. O tamanho das nanopartículas foi medido, relacionando-o com a taxa de intensidade de dispersão de luz pelas partículas de cada amostra, sendo que foram necessárias algumas diluições consoante a concentração de cada uma, proporcionando a redução da probabilidade de interação entre as nanopartículas, devido à sua tendência de flocculação. Foram realizadas três medições para cada amostra.

4.5.4 Potencial Zeta

O potencial zeta das nanopartículas foi medido a 25 °C, no mesmo equipamento usado para medir o seu tamanho, como descrito anteriormente. As amostras foram analisadas em cuvetes específicas para medições de potencial zeta, com elétrodos de cargas diferentes em cada extremidade. Foram realizadas três medições para cada amostra.

4.5.5 Método DPPH

A atividade antioxidante das amostras foi determinada a partir do método de redução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), um radical livre estável. A determinação da atividade antioxidante por este método baseia-se na reação que ocorre quando um átomo de azoto da molécula de DPPH é reduzido ao receber um átomo de hidrogénio proveniente de um composto antioxidante, que provoca a alteração da sua cor de roxo para amarelo (Scherer e Godoy, 2008).

Na realização deste método relacionou-se a atividade antioxidante das amostras com o respetivo conteúdo fenólico de cada uma, em termos de equivalentes de ácido gálico, dado que quanto maior for a % de DPPH reduzida, maior será o conteúdo fenólico presente e, conseqüentemente, maior a capacidade antioxidante das amostras em estudo (Scherer e Godoy, 2008).

Assim, 3,0 mg de DPPH foram transferidos para um balão volumétrico de 20 mL e cheio até à marca com metanol. De seguida, 0,15 mL de cada amostra foram misturados com 1,5 mL de metanol e 0,5 mL da solução de DPPH ($c = 0,15$ mg/mL), agitadas vigorosamente e deixadas em repouso e em ambiente escuro por 15 minutos. A absorvância destas foi medida em cuvetes de plástico, num espectrofotómetro UV/Vis, a um comprimento de onda de 517 nm e o branco utilizado foi metanol puro. Foram realizados três testes para cada amostra.

A percentagem de redução de DPPH em cada solução foi calculada através da equação (1).

$$\% DPPH = \frac{A(\text{controlo}) - A(\text{amostra})}{A(\text{controlo})} \times 100 \quad (1)$$

Onde, $A(\text{amostra})$ é a absorvância das soluções preparadas anteriormente e $A(\text{controlo})$ é a absorvância de soluções preparadas ao mesmo tempo que as primeiras, com a diferença de que em vez de se ter adicionado a amostra, adicionou-se metanol na mesma quantidade (0,5 mL).

A concentração das amostras, em $\mu\text{mol/ml}$, foi determinada com recurso à curva de calibração apresentada no Anexo A.

O conteúdo fenólico total foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por mililitro de solução.

4.5.6 Testes de atividade antibacteriana

Com o objetivo de verificar se as amostras de nanopartículas de lenhina tinham atividade antibacteriana, realizaram-se dois ensaios de difusão em disco e um em que as amostras foram misturadas diretamente com as bactérias. Foram utilizadas três bactérias: *Escherichia coli* (Gram negativa); *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa). Estes ensaios foram realizados na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

No primeiro procedimento, replicaram-se as três bactérias, para seguidamente inocular, com suspensões destas em água destilada (0,5 McFarland), os meios de cultura preparados

previamente com ágar Mueller-Hinton. Colocaram-se os discos de papel nas caixas de petri e, sobre estes, 10 μ L de cada amostra de nanopartículas preparadas anteriormente pelo método descrito em 4.3.1. As caixas foram deixadas em repouso durante a noite numa estufa a 37 °C.

O segundo procedimento realizou-se de forma idêntica ao primeiro, alterando apenas o tipo de amostras. Neste foram analisadas quatro amostras em suspensão em água destilada: duas com lenhina comercial em pó, com concentrações de 5% e 10%, e duas com nanopartículas preparadas anteriormente na experiência nº 10 do método descrito em 4.3.1, com concentrações de 5% e 10% também. Estes 2 últimos procedimentos serviram para avaliar os halos (área mais clara que rodeia o disco e onde não existe crescimento bacteriano) formados em volta dos discos de papel e, assim, avaliar o poder antibacteriano das amostras colocadas sobre estes.

No terceiro e último procedimento, as amostras em análise foram suspensões em água destilada das nanopartículas preparadas anteriormente na experiência nº 1 do método descrito em 4.3.1, com as concentrações de 5% e 10%. Fez-se a suspensão da bactéria *Staphylococcus aureus* em 5 mL de água destilada (0,5 McFarland). De seguida, foram retirados 1 mL de cada amostra e misturados com 1 mL da suspensão da bactéria. Seguiu-se a diluição, por três vezes, destas preparações e o inóculo dos meios de cultura com Mueller-Hinton com as mesmas. As caixas de petri foram deixadas em repouso numa estufa a 37 °C e analisadas após 6 e 24 horas. Este procedimento serviu para avaliar a evolução do crescimento das bactérias ao contactar com as amostras em causa e, assim, avaliar o poder antibacteriano das mesmas.

5 Resultados e discussão

5.1 Caracterização das nanopartículas preparadas

5.1.1 Morfologia das nanopartículas através de SEM

As nanopartículas preparadas pelos métodos *self-assembly* e precipitação ácida foram analisadas quanto à sua morfologia através da técnica de SEM, com a mesma ampliação.

a) Método *Self-Assembly*

A partir das imagens obtidas e apresentadas nas Figuras 5.1 a) a 5.1 c), para as nanopartículas preparadas pelo primeiro método da secção 4.2.1, é possível observar a presença de partículas aproximadamente esféricas, o que se traduz em bons resultados, visto que a formação de partículas mais densas é benéfica para a sua posterior aplicação. A formação destas nanopartículas resulta das interações intermoleculares entre os anéis aromáticos da lenhina, que são fortalecidas pela adição de água, já que as moléculas de lenhina se caracterizam pela sua hidrofobicidade, contribuindo assim, para a sua auto-associação.

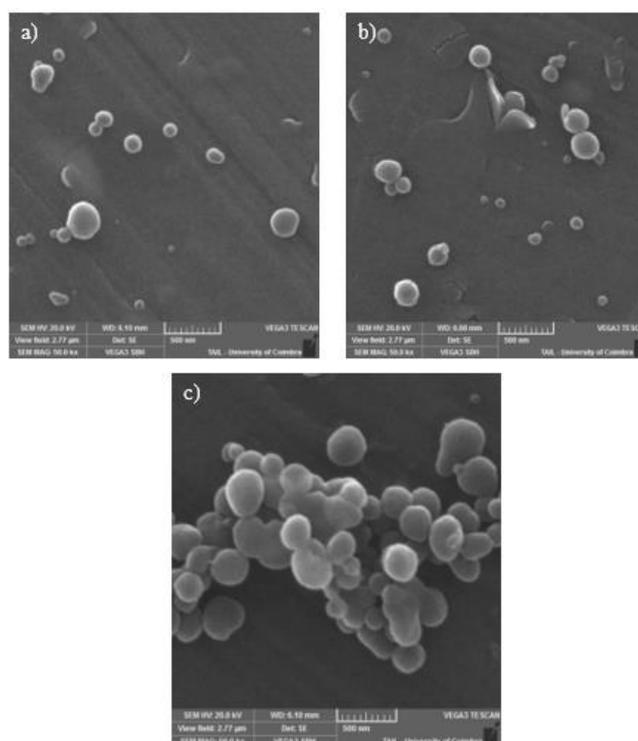


Figura 5.1 – Análise SEM de nanopartículas preparadas por *self-assembly* pelo primeiro método de 4.2.1: a) Velocidade de gotejamento de 0,023 mL/s; b) Velocidade de gotejamento de 0,054 mL/s; c) Velocidade de gotejamento de 0,081 mL/s.

b) Método de Precipitação ácida

A Figura 5.2 a) representa as partículas obtidas através do primeiro procedimento de 4.2.2, onde se observa um grande aglomerado de partículas irregulares, com alguma tendência para a formação esférica. A grande concentração da solução de lenhina nesta amostra pode fundamentar este agregado. Na Figura 5.2 b), correspondente às nanopartículas preparadas pelo terceiro método de precipitação ácida, descrito na secção 4.2.2, não foi possível observar partículas. A amostra em causa diz respeito à que contém a concentração de SDS (dodecilsulfato de sódio) de 0 mM, o que poderá justificar este resultado, dado que maiores concentrações de surfatante originam partículas mais estáveis e de menores tamanhos, dado que se adsorvem às moléculas da lenhina promovendo a sua contração, formando pequenos aglomerados.

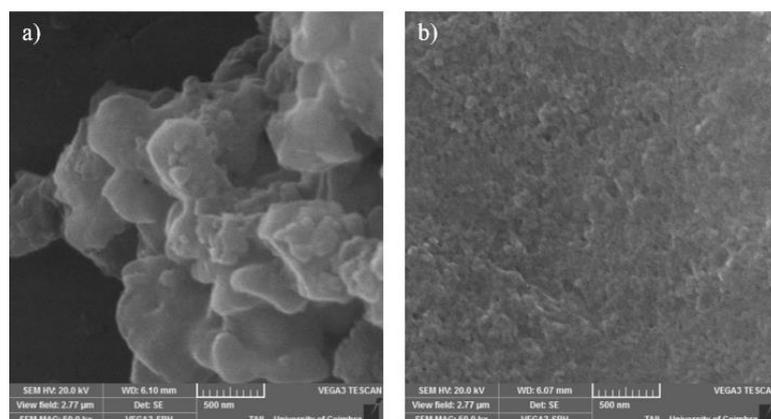


Figura 5.2 – Análise SEM de nanopartículas preparadas por precipitação ácida através do: a) primeiro procedimento de 4.2.2; b) terceiro procedimento de 4.2.2 com a concentração de SDS de 0 mM.

5.1.2 Morfologia das nanopartículas através de TEM

As nanopartículas preparadas pelos métodos *self-assembly* e precipitação ácida foram analisadas quanto à sua morfologia através da técnica de TEM, com a mesma ampliação.

a) Método *Self-Assembly*

Na Figura 5.3 está representada a imagem obtida para a amostra sujeita à menor velocidade de gotejamento de água destilada, pertencente ao primeiro procedimento de *self-assembly* da secção 4.2.1. A imagem tem alguma concordância com a que foi obtida pela técnica SEM, como a visualização de algumas partículas esféricas.

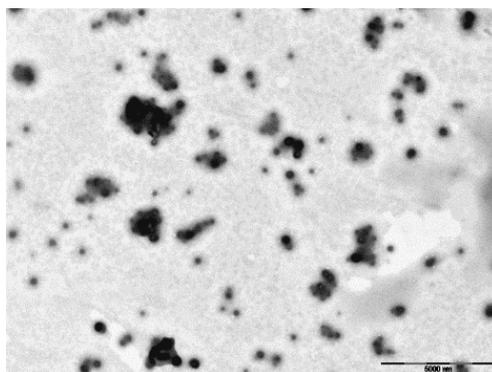


Figura 5.3 – Análise TEM de nanopartículas preparadas por *self-assembly* pelo primeiro método de 4.2.1, com velocidade de gotejamento de 0,023 mL/s.

b) Método de Precipitação ácida

Nas imagens obtidas e representadas na Figura 5.4 não é possível visualizar as partículas de forma individualizada - apenas aglomerados destas - sendo que também não se observa uma maior aglomeração das partículas com a adição de uma maior quantidade de surfatante, como seria esperado. Provavelmente terá ocorrido alguma alteração, causada pelo tratamento das amostras previamente à visualização no equipamento, ou devido ao facto de estas terem sido analisadas algum tempo depois da sua preparação.

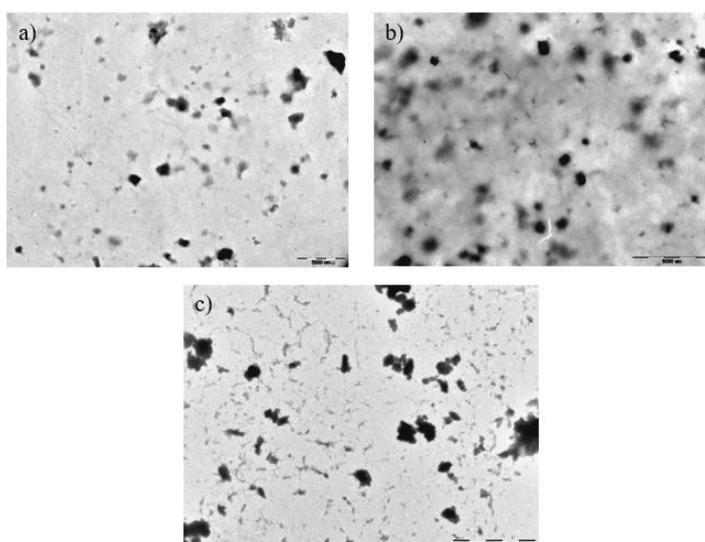


Figura 5.4 – Análise TEM de nanopartículas preparadas por precipitação ácida através do: a) terceiro procedimento em 4.2.2 com concentração de SDS de 0 mM; b) terceiro procedimento em 4.2.2 com concentração de SDS de 12 mM; c) primeiro procedimento em 4.2.2.

5.1.3 Tamanho das nanopartículas através de DLS

As nanopartículas preparadas pelos métodos *self-assembly* e precipitação ácida foram analisadas quanto ao seu diâmetro através da técnica de DLS, sendo que a distribuição dos tamanhos em função da percentagem de intensidade se encontra representada nas Figuras 5.6 e 5.8, respetivamente.

a) Método *Self-Assembly*

Os resultados para as nanopartículas produzidas pelo primeiro e segundo procedimento experimental de *self-assembly* da secção 4.2.1 demonstram que o tamanho médio das partículas variou entre 177 nm e 489 nm, correspondendo o primeiro valor ao tamanho médio das partículas produzidas pelo segundo procedimento. A partir da Figura 5.5, é possível concluir que, à medida que a velocidade de gotejamento da água destilada aumenta, o diâmetro das nanopartículas diminui ligeiramente, dado que com maiores velocidades, o tempo de agregação das moléculas e crescimento das partículas é reduzido.

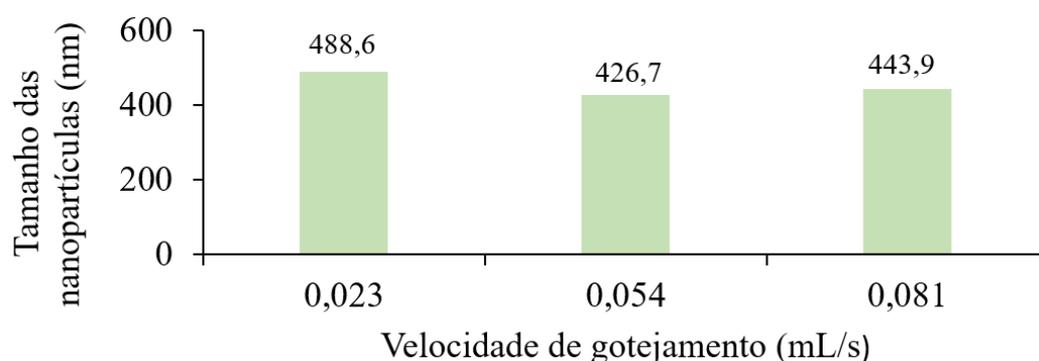


Figura 5.5 – Tamanho das nanopartículas em função da velocidade de gotejamento de água destilada.

A partir da Figura 5.6 a) é possível observar que o primeiro procedimento gera partículas na mesma gama de tamanhos e através do segundo são produzidas partículas com diâmetros diferentes, dado que a luz é dispersa com diferentes intensidades, como é possível observar na Figura 5.6 b).

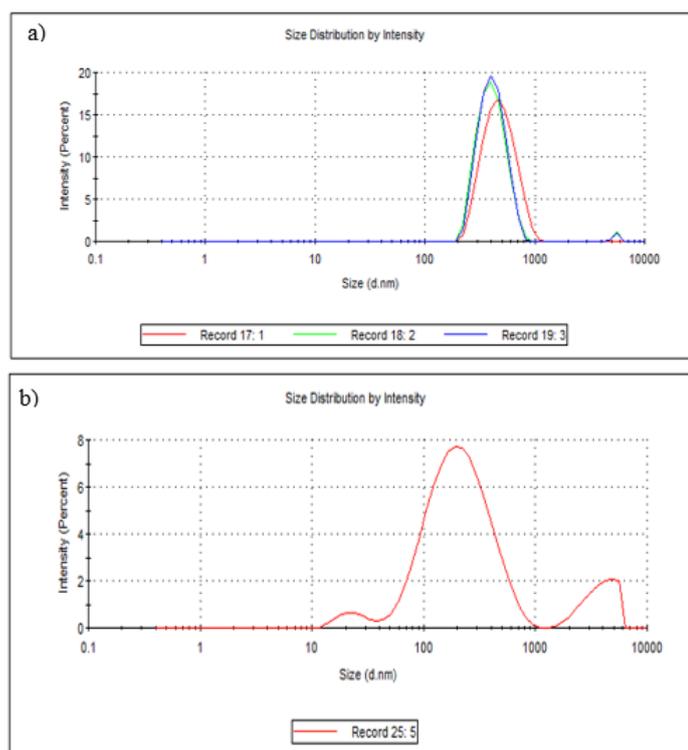


Figura 5.6 – Análise DLS da distribuição do tamanho das nanopartículas preparadas por *self-assembly*, através do: a) Primeiro procedimento de 4.2.1; b) Segundo procedimento de 4.2.1.

b) Método de Precipitação ácida

Na Figura 5.7 observam-se os diferentes tamanhos das nanopartículas preparadas pelo terceiro procedimento de precipitação ácida da secção 4.2.2., em que foram adicionadas diferentes concentrações de surfatante. O tamanho médio das partículas está entre os valores 80 nm e 129 nm. A partir destes dados é possível presenciar uma diminuição de tamanho com o aumento das concentrações de surfatante, tal como previsto pela literatura, de onde se pode concluir que a adição de surfatante traz benefícios à preparação de nanopartículas, sendo que menores partículas implica maior área superficial, propiciando uma melhor aplicação destas.

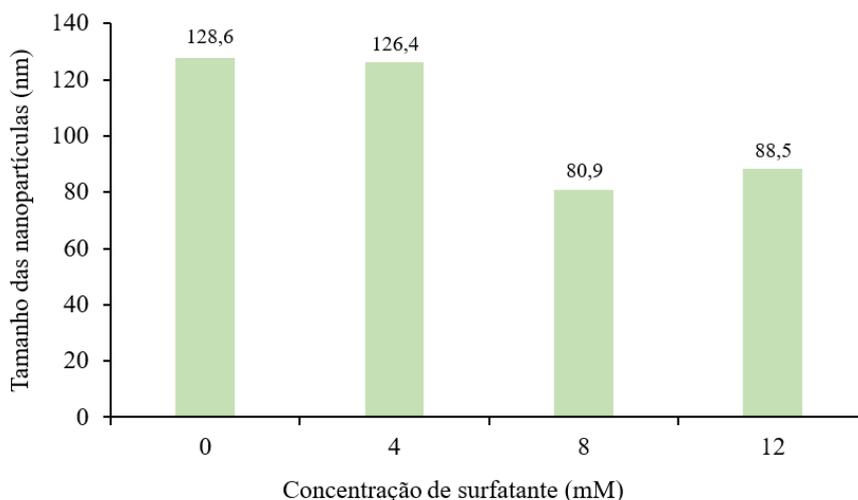


Figura 5.7 – Tamanho das nanopartículas em função da concentração de SDS.

A partir da Figura 5.8, retira-se que as partículas formadas pelas experiências 1 (concentração de SDS de 0 mM), 2 (concentração de SDS de 4 mM) e 4 (concentração de SDS de 12 mM) apresentam tamanhos dentro da mesma gama, ao contrário das formadas pela experiência 3 (concentração de SDS de 8 mM), sendo resultado talvez de um erro na preparação.

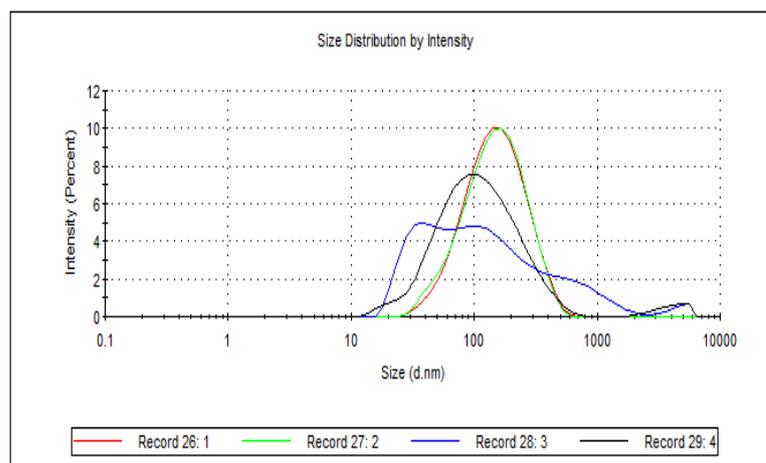


Figura 5.8 – Análise DLS da distribuição dos tamanhos das nanopartículas preparadas por precipitação ácida através do terceiro procedimento em 4.2.2.

5.1.4 Conteúdo fenólico das nanopartículas

O conteúdo fenólico das amostras de nanopartículas preparadas pelos métodos de *self-assembly* e de precipitação ácida foi determinado com o intuito de o relacionar com a atividade antioxidante destas, recorrendo ao método de redução de DPPH.

a) Método *Self-Assembly*

A partir da Figura 5.9, verifica-se que o conteúdo fenólico varia entre os valores de $2,97 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL e $3,06 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL e, que o maior conteúdo fenólico se encontra na amostra sujeita à menor velocidade de adição de água. Este resultado era esperado, dado que, como explicado anteriormente, uma menor velocidade de adição de água, faz com que as partículas de lenhina tenham mais tempo para se agregar, dando origem a maiores diâmetros, o que faz com que esta amostra apresente uma maior concentração de lenhina, e conseqüentemente um maior conteúdo fenólico.

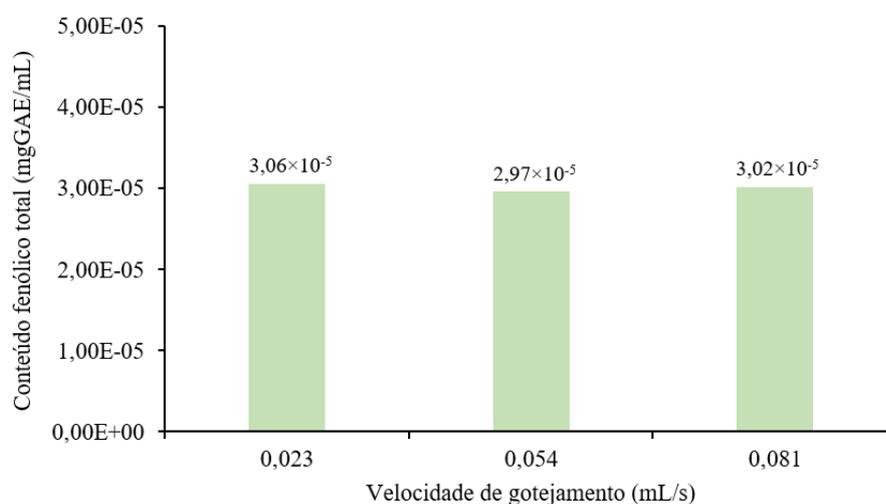


Figura 5.9 – Conteúdo fenólico total em função da velocidade de gotejamento.

b) Método de Precipitação ácida

Na Figura 5.10, verifica-se que o conteúdo fenólico varia entre os valores de $1,50 \times 10^{-6}$ mgGAE/mL e $3,00 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL e, que o maior conteúdo fenólico se encontra na amostra com a concentração de surfatante de 0 mM. Verifica-se uma diminuição do conteúdo fenólico com a adição de surfatante, o que era esperado segundo a literatura, dado que a adsorção do surfatante às moléculas da lenhina, provoca a sua agregação, devido a forças eletrostáticas, logo, quanto maior a concentração deste composto, maiores são as forças intermoleculares, o que causa uma contração das nanopartículas, formando agregados mais pequenos. Dado que os compostos fenólicos são constituintes da lenhina, quanto menor for o tamanho das partículas, menor será o conteúdo fenólico.

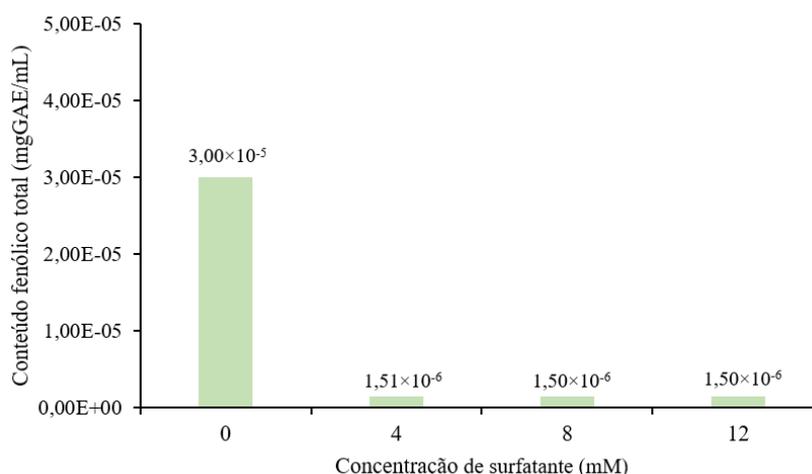


Figura 5.10 – Conteúdo fenólico em função da concentração de SDS.

5.2 Análise estatística da otimização das propriedades das nanopartículas

Na Figura 5.11 é possível observar as nanopartículas formadas pelo método experimental descrito na secção 4.3.1, após a fase de diálise.



Figura 5.11 – Nanopartículas formadas pelo método experimental descrito na secção 4.3.1.

Tal como descrito anteriormente, com o objetivo de analisar quais as condições ótimas de preparação de nanopartículas para o método experimental presente na secção 4.3.1, avaliou-se a influência da concentração de lenhina, da concentração de surfatante e do pH no tamanho das nanopartículas e no conteúdo fenólico das mesmas.

No Quadro 5.1 encontram-se os respetivos resultados das dez experiências realizadas, em que se fizeram variar os três fatores. O tamanho das partículas foi determinado a partir de DLS e o conteúdo fenólico foi determinado a partir do método de redução de DPPH, cuja concentração reduzida foi posteriormente convertida em termos de conteúdo fenólico total, em mgGAE/ml.

Analisando estes dados, retira-se que, em relação ao tamanho das partículas, para a mesma concentração de lenhina e de surfatante, um aumento de pH traduz-se numa diminuição do tamanho das partículas. Isto deve-se ao facto de a lenhina ser solúvel em condições alcalinas. A influência da concentração de surfatante não foi esclarecedora, dado que para os mesmos valores de concentração de lenhina e de pH, um aumento da concentração de surfatante, em alguns casos traduziu-se num aumento do tamanho das partículas e, noutros casos numa diminuição. O mesmo se pode observar para a influência da variação da concentração de lenhina, fixados os outros dois fatores. O menor tamanho de partículas verificou-se na experiência nº 1, com o valor de 91,04 nm.

Quanto ao conteúdo fenólico, verifica-se um aumento deste com o aumento da concentração de lenhina, fixando a concentração de surfatante e o pH, que acontece porque os compostos fenólicos fazem parte da composição da lenhina, logo, quanto maior a concentração desta, maior será o conteúdo fenólico. Para o caso em que se faz variar o pH é possível observar um

ligeiro aumento do conteúdo fenólico, ainda que sem grande significância. Por fim, para um aumento da concentração de surfatante verifica-se um diminuto aumento do conteúdo fenólico.

Sabendo que um maior teor em compostos fenólicos se traduz numa maior capacidade antioxidante, na experiência nº 1 foi onde se obteve maior capacidade antioxidante das nanopartículas, com $4,56 \times 10^{-3}$ mgGAE/ml.

Quadro 5.1 – Condições experimentais da preparação de nanopartículas e respetivo tamanho e conteúdo fenólico.

Nº da experiência	Padrão	Concentração de lenhina (mg/ml)	Concentração de surfatante (% m/v lenhina)	pH	Tamanho das nanopartículas (nm)	Conteúdo fenólico total (mgGAE/ml)
1	+++	35	10	5	91,04	$4,56 \times 10^{-3}$
2	-+-	5	10	2	939,00	$6,43 \times 10^{-4}$
3	000	20	5,5	3,5	1373,00	$2,58 \times 10^{-3}$
4	-++	5	10	5	181,70	$7,75 \times 10^{-4}$
5	--+	5	1	5	97,31	$7,13 \times 10^{-4}$
6	+ - +	35	1	5	149,73	$4,02 \times 10^{-3}$
7	---	5	1	2	2515,33	$6,80 \times 10^{-4}$
8	+ - -	35	1	2	2048,00	$3,90 \times 10^{-3}$
9	000	20	5,5	3,5	1347,00	$2,40 \times 10^{-3}$
10	++-	35	10	2	2515,50	$3,95 \times 10^{-3}$

5.2.1 Efeito no conteúdo fenólico

A Figura 5.12 representa um diagrama de Pareto. O objetivo de um diagrama de Pareto é avaliar a importância de cada variável independente (fator) e as suas interações na variação dos valores das variáveis resposta, para um intervalo de confiança de 95% (Systems, 2022).

Neste trabalho, o diagrama de Pareto da Figura 5.12 foi utilizado para entender melhor a ordem de importância dos fatores (concentração de lenhina; concentração de surfatante e pH) no conteúdo fenólico das nanopartículas de lenhina, e consequentemente, na sua capacidade antioxidante. Com este, verifica-se que a concentração de lenhina é o fator que provoca um maior efeito no conteúdo fenólico, seguida do pH e, por último, a concentração de surfatante.

Source	LogWorth		PValue
Concentração de lenhina(5,35)	4,415		0,00004
pH(2,5)	1,069		0,08524
Concentração de surfactante(1,10)	0,744		0,18020
Concentração de surfactante*pH	0,712		0,19418
Concentração de lenhina*Concentração de surfactante	0,682		0,20818
Concentração de lenhina*pH	0,682		0,20818

Figura 5.12 – Efeito dos fatores e suas interações no conteúdo fenólico das nanopartículas.

A Figura 5.13 serviu para comparar os valores de conteúdo fenólico previsto pelo modelo matemático (2) com os valores experimentais obtidos e apresentados no Quadro 5.1. A qualidade de ajuste é bastante satisfatória, dado que existe uma boa concordância entre os valores experimentais e os valores previstos pelo modelo, como é possível fundamentar pelo valor de $R^2 = 0,99801$.

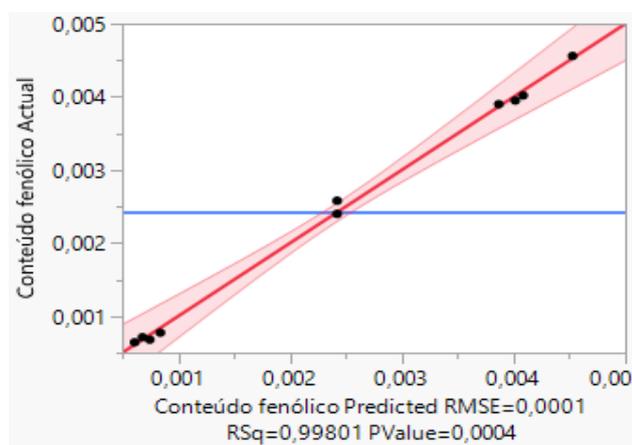


Figura 5.13 – Regressão linear entre os valores de conteúdo fenólico previstos pelo modelo matemático e os valores experimentais para as nanopartículas preparadas.

O modelo matemático de previsão é representado pela equação (2), onde CF é o conteúdo fenólico; CL é a concentração de lenhina e CS é a concentração de surfatante.

$$CF = 0,0024221 + 0,001702375 \times \left(\frac{CL - 20}{15}\right) + 0,000076875 \times \left(\frac{CS - 5,5}{4,5}\right) + 0,000111875 \times \left(\frac{pH - 3,5}{1,5}\right) + \left(\frac{CL - 20}{15}\right) \times \left(\left(\frac{CS - 5,5}{4,5}\right) \times 0,000070625\right) + \left(\frac{CL - 20}{15}\right) \times \left(\left(\frac{pH - 3,5}{1,5}\right) \times 0,000070625\right) + \left(\frac{CS - 5,5}{4,5}\right) \times \left(\left(\frac{pH - 3,5}{1,5}\right) \times 0,000073625\right) \quad (2)$$

5.2.2 Efeito no tamanho das partículas

À semelhança do conteúdo fenólico, também para o tamanho das partículas foi analisada a ordem de influência dos três fatores, através de um diagrama de Pareto.

A Figura 5.14 demonstra que o pH é o fator com maior relevância no tamanho das partículas, seguido da concentração de surfactante e por último da concentração de lenhina.

Source	LogWorth	PValue
pH(2,5)	1,895	0,01274
Concentração de lenhina*Concentração de surfactante	0,572	0,26775
Concentração de lenhina*pH	0,326	0,47260
Concentração de surfactante*pH	0,321	0,47713
Concentração de surfactante(1,10)	0,305	0,49559
Concentração de lenhina(5,35)	0,301	0,50006

Figura 5.14 – Efeito dos fatores e suas interações no tamanho das nanopartículas.

Na Figura 5.15, ao comparar os valores de tamanho das partículas previstos pelo modelo matemático (3) com os valores experimentais obtidos e apresentados no Quadro 5.1, observa-se que existe uma boa concordância entre eles, a partir do valor de $R^2 = 0,92$. Existe uma melhor concordância entre os valores de conteúdo fenólico do que entre os valores de tamanho de partículas.

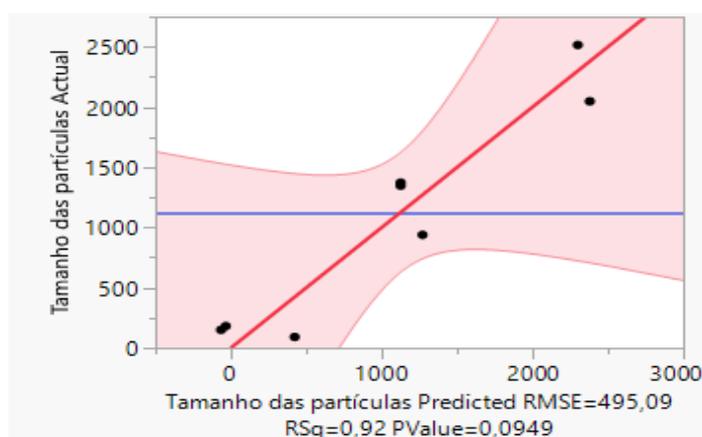


Figura 5.15 – Regressão linear entre os valores do tamanho previsto pelo modelo matemático e os valores experimentais para as nanopartículas preparadas.

O modelo de ajuste dos valores foi expressa a partir da equação (3), onde TP é o tamanho das partículas; CL é a concentração de lenhina e CS é a concentração de surfatante.

$$\begin{aligned}
 TP = & 1125,76 + 133,86625 \times \left(\frac{CL - 20}{15}\right) - 135,39125 \times \left(\frac{CS - 5,5}{4,5}\right) - 937,25625 \times \\
 & \left(\frac{pH - 3,5}{1,5}\right) + \left(\frac{CL - 20}{15}\right) \times \left(\left(\frac{CS - 5,5}{4,5}\right) \times 237,59375\right) + \left(\frac{CS - 5,5}{4,5}\right) \times \left(\left(\frac{pH - 3,5}{1,5}\right) \times \right. \\
 & \left. 141,81625\right) \quad (3)
 \end{aligned}$$

5.2.3 Apresentação das condições ótimas

Por último, através da função “Desirability” do software JMP® Pro 16, foram apresentadas as condições ótimas de preparação de nanopartículas para o método em estudo e os correspondentes valores de conteúdo fenólico e tamanho de partículas a que estas propriedades dariam origem.

Estas informações encontram-se na Figura 5.16, de onde se retira que os valores desejáveis para uma minimização do tamanho das nanopartículas e uma maximização do conteúdo fenólico são 422,96 nm e $4,53 \times 10^{-3}$ mgGAE/ml, respetivamente. Estes valores hipotéticos seriam alcançados a partir de uma concentração de lenhina de 35 mg/mL, uma concentração de surfatante de 10 % (m/v lenhina) e com um pH de 5.

A partir destes gráficos é possível constatar que o tamanho das partículas aumenta ligeiramente com a concentração de lenhina e de surfatante e diminui drasticamente com o aumento do pH. O conteúdo fenólico e, portanto, a capacidade antioxidante das partículas aumenta drasticamente com a concentração de lenhina e aumenta ligeiramente com a concentração de surfatante e aumento do pH.

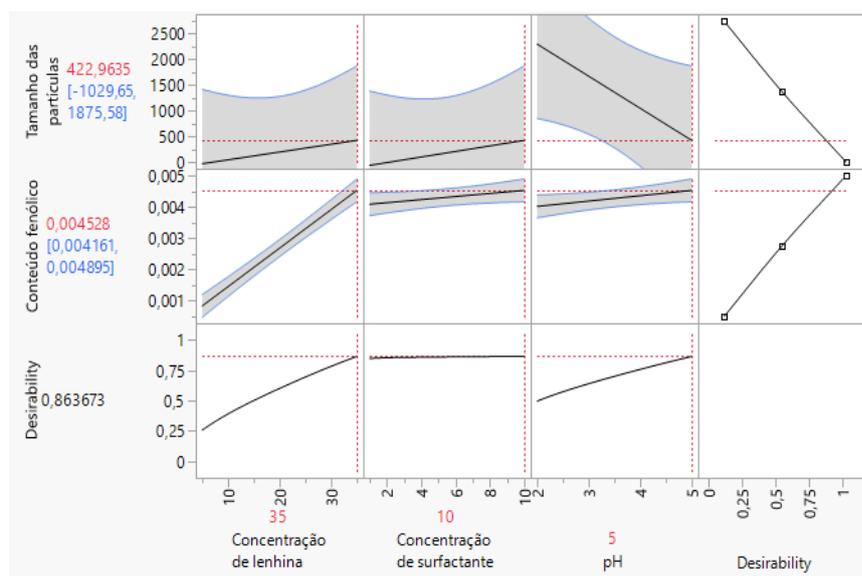


Figura 5.16 – Condições ótimas de preparação de nanopartículas para o método em estudo e correspondentes valores de conteúdo fenólico e tamanho de partículas.

5.3 Efeito da adição de surfatante nas nanopartículas

Com os resultados obtidos anteriormente, não ficou suficientemente explícito se a adição de surfatante traria efetivamente grandes vantagens à preparação de nanopartículas de lenhina, como descrito na literatura, visto que, por exemplo, nas experiências nº 5, 6, 7 e 8 a quantidade adicionada foi bastante pouca.

Portanto, com o objetivo de analisar este aspeto, no Quadro 5.2 encontram-se os resultados do tamanho e do conteúdo fenólico das nanopartículas preparadas através das mesmas condições das experiências nº 1, 3 e 4, já especificadas no Quadro 5.1 e das nanopartículas preparadas com a mesma concentração de lenhina e pH que as anteriores, com a diferença de que a estas não foi adicionado surfatante.

Quadro 5.2 – Condições experimentais da preparação de nanopartículas e respetivo tamanho e conteúdo fenólico.

Nº da experiência	Concentração de lenhina (mg/ml)	Concentração de surfatante (% m/v lenhina)	pH	Tamanho das nanopartículas (nm)	Conteúdo fenólico total (mgGAE/ml)
1	35	10	5	117,80	$5,75 \times 10^{-3}$
1 a	35	0	5	126,46	$4,83 \times 10^{-3}$
3	20	5,5	3,5	3631,33	$3,87 \times 10^{-3}$
3 a	20	0	3,5	4041,00	$3,61 \times 10^{-3}$
4	5	10	5	144,10	$8,62 \times 10^{-4}$
4 a	5	0	5	105,23	$8,04 \times 10^{-4}$

a- Experiências em que não é adicionado surfatante.

5.3.1 Tamanho das partículas pelo DLS

Na Figura 5.17 estão representados os gráficos da distribuição do tamanho das nanopartículas em função da percentagem de intensidade, obtidos a partir da técnica de DLS.

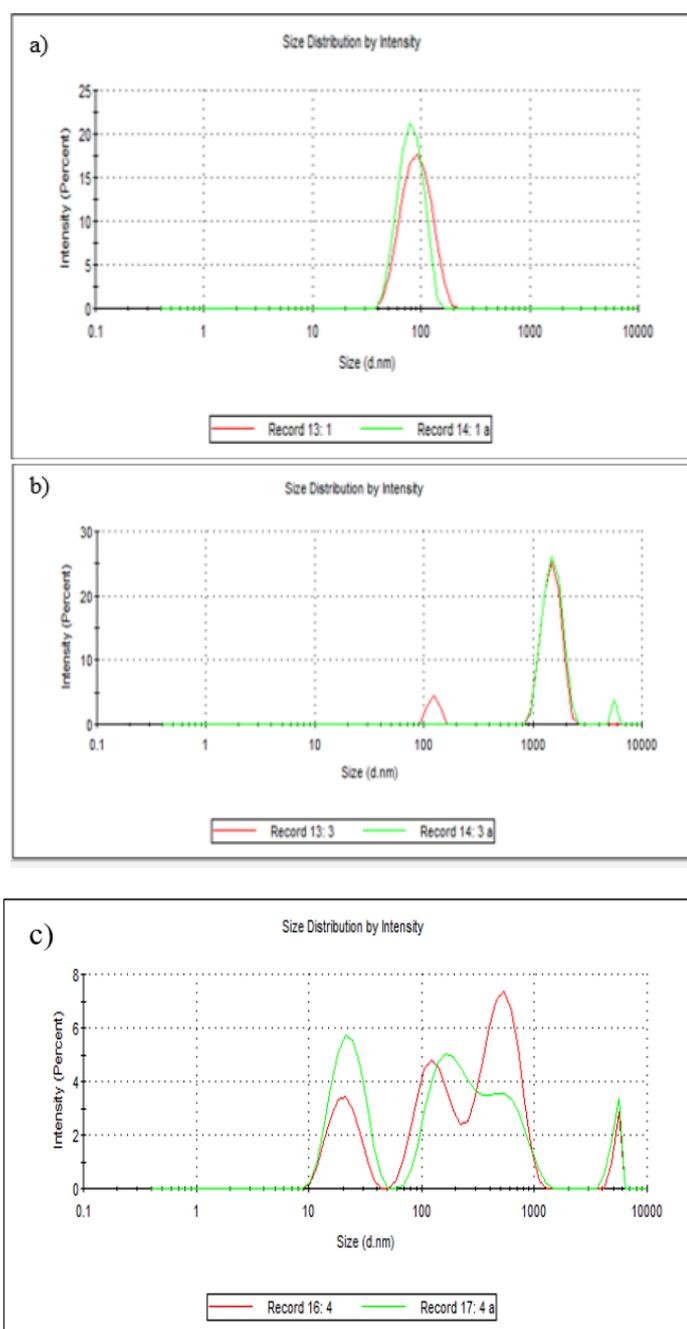


Figura 5.17 – Análise DLS da distribuição dos tamanhos das nanopartículas preparadas: a) Experiência 1 e 1a; b) Experiência 3 e 3a; c) Experiência 4 e 4a.

A partir da análise do Quadro 5.2 e da Figura 5.17, conclui-se que a adição de surfatante não produziu diferenças significativas, nem no tamanho, nem no conteúdo fenólico das

nanopartículas produzidas, ao contrário do que seria esperado segundo a literatura, em que uma maior quantidade de surfatante se traduziria numa diminuição dos diâmetros das partículas.

5.3.2 Estabilidade das nanopartículas pelo Potencial Zeta

Na Figura 5.18 apresentam-se os gráficos do potencial zeta das nanopartículas. Os gráficos abaixo representados indicam uma estabilidade coloidal moderada para os sistemas, visto que valores reportados na literatura para nanopartículas de lenhina variam entre -28 mV e -60 mV (Pavaneli, 2020). O potencial negativo indica que a superfície das partículas é carregada negativamente, possivelmente devido às cargas negativas dos grupos fenólicos da lenhina.

Em concordância com o verificado para o tamanho das partículas, também a adição de surfatante não produz efeitos significativos na sua estabilidade, analisando o potencial zeta.

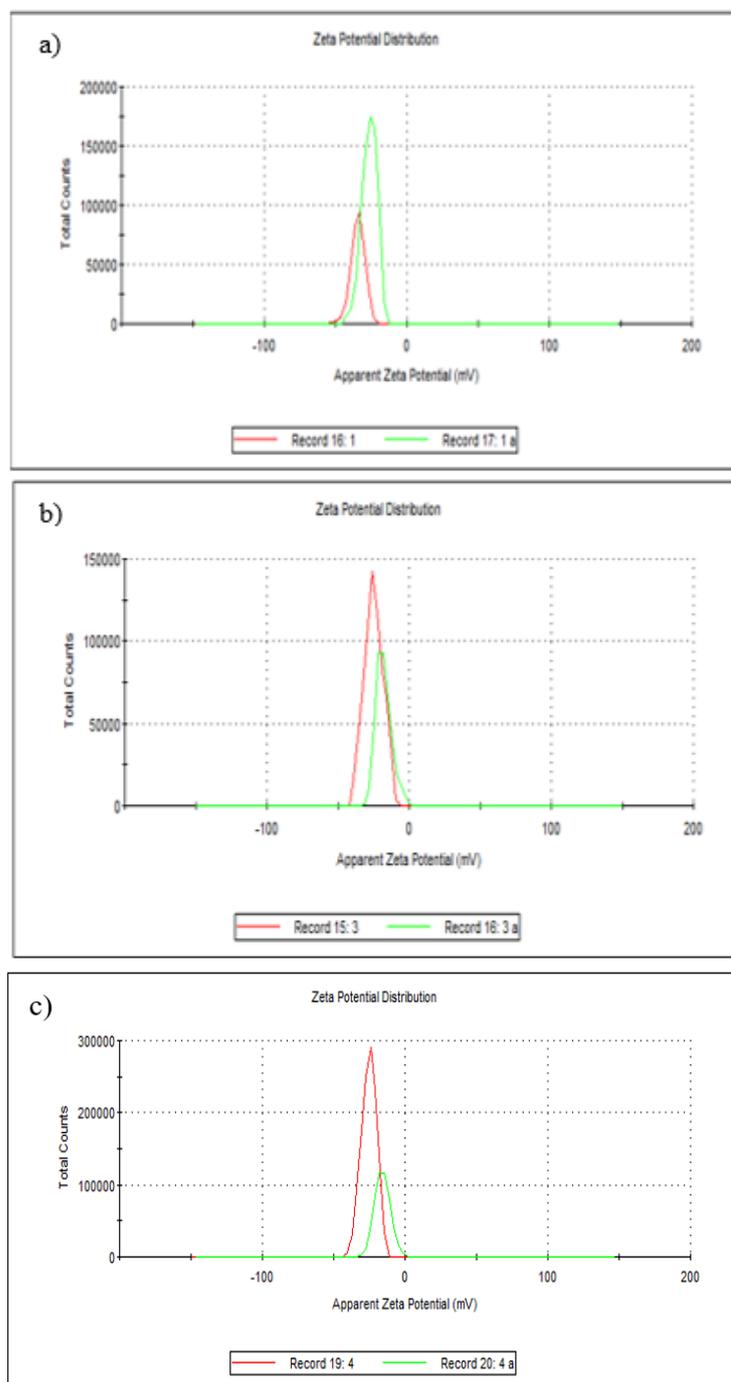


Figura 5.18 – Análise do potencial zeta das nanopartículas preparadas: a) Experiência 1 e 1a; b) Experiência 3 e 3a; c) Experiência 4 e 4a.

5.3.3 Morfologia das nanopartículas através de SEM

Uma outra prova de que a adição de surfatante não produziu efeitos nas nanopartículas sintetizadas por este método, encontra-se representada na Figura 5.19, onde se visualiza, através da técnica SEM, que a forma das nanopartículas se mantém inalterada com a introdução de surfatante, apresentando nas duas uma forma esférica.

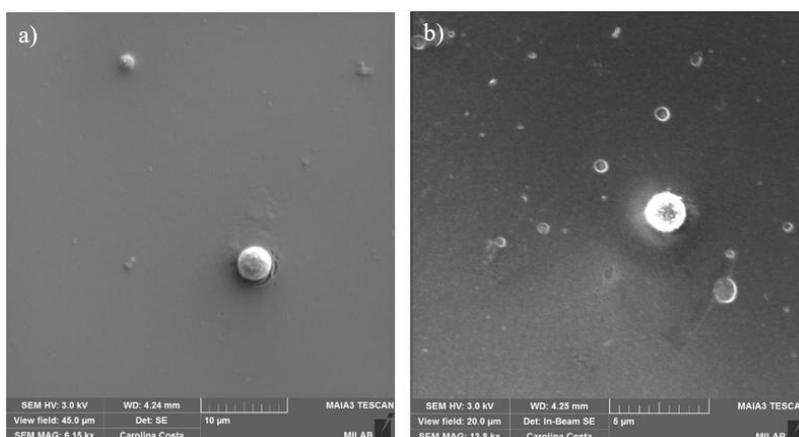


Figura 5.19 - Análise SEM de nanopartículas preparadas: a) Experiência 1; b) 1a.

5.4 Atividade antibacteriana

A partir do primeiro método de difusão em disco descrito na secção 4.5.6, após 24 horas na estufa, verificaram-se pequenos halos formados em volta dos discos das amostras correspondentes às experiências 10 e 1 dos Quadros 5.1 e 5.2, respetivamente, em contacto com a bactéria *Staphylococcus aureus*. Este resultado poderá indicar alguma atividade antibacteriana contra esta bactéria por parte destas amostras, ainda que muito diminuta.

Ao analisar os resultados do segundo procedimento descrito na secção 4.5.6, verificou-se que foram formados halos em todos os discos das amostras que foram colocadas em contacto com a bactéria *Staphylococcus aureus*. Ainda que não tenha ocorrido uma difusão uniforme, os halos formados apresentam maiores diâmetros do que os formados pelo primeiro procedimento, possivelmente devido às maiores concentrações das suspensões preparadas.

A partir destes resultados, é possível concluir que ocorreu alguma atividade contra bactérias de Gram positivo, visto que apenas nas caixas que continham a bactéria *Staphylococcus aureus* foram formados halos, ainda que pequenos.

Os resultados obtidos a partir do terceiro procedimento da secção 4.5.6, mostram que não existiu crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, nem mesmo no momento inicial. O que era esperado a partir deste ensaio era que, em caso de existência de atividade antibacteriana por parte das suspensões preparadas, ocorresse uma inibição gradual da bactéria ao longo das 24 horas, e não uma eliminação total. A explicação para este fenómeno poderá passar pelo facto de o pH das suspensões não estar exatamente neutro, e este ter resultado na eliminação total da bactéria, ou outra característica das mesmas não evidenciada.

Na Figura 5.20 apresentam-se os resultados dos 3 procedimentos, respetivamente.

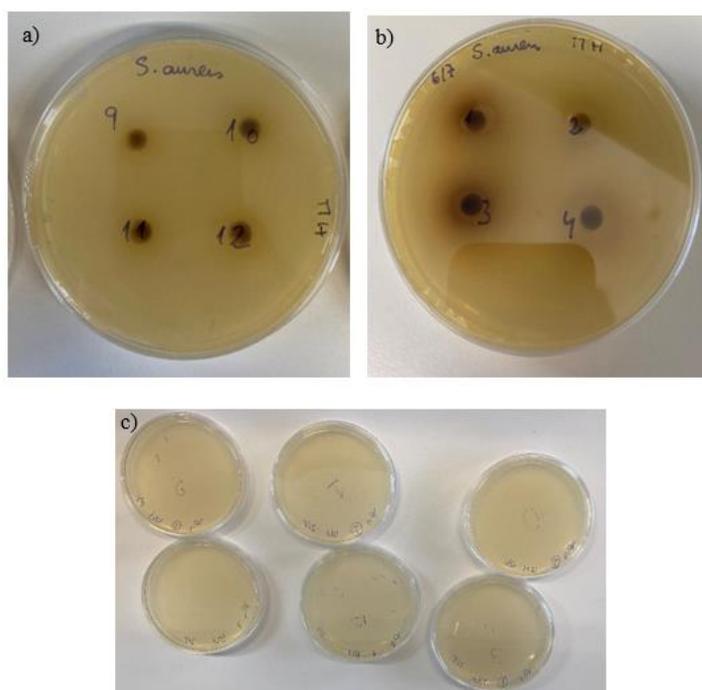


Figura 5.20 – Resultados da atividade antibacteriana dos procedimentos descritos em 4.5.6: a) Primeiro procedimento; b) Segundo procedimento; c) Terceiro procedimento

6 Conclusões e sugestões para futuros trabalhos

6.1 Conclusões

Este trabalho iniciou-se com a síntese de nanopartículas de lenhina através de alguns métodos de *self-assembly* e precipitação ácida, tendo por base algumas preparações experimentais descritas em artigos científicos. Algumas preparações foram caracterizadas quanto à morfologia das suas partículas, através das técnicas SEM e TEM; quanto ao tamanho das partículas, através da técnica DLS e quanto ao conteúdo fenólico presente nas mesmas, através do método de redução de DPPH.

As nanopartículas preparadas via *self-assembly* apresentaram, na sua maioria, formas esféricas, sendo que os seus tamanhos médios variaram entre os 177 nm e 489 nm, o que permitiu concluir que, à medida que a velocidade de gotejamento da água destilada aumenta, o diâmetro das nanopartículas diminui ligeiramente, dado que com maiores velocidades, o tempo de agregação das moléculas de lenhina, e o consequente crescimento das partículas é reduzido. Quanto ao conteúdo fenólico presente nas nanopartículas, este variou entre os valores $2,97 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL e $3,06 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL, correspondendo o último à amostra sujeita à menor velocidade de adição de água.

A morfologia das nanopartículas preparadas através de precipitação ácida não foi possível observar com clareza, provavelmente devido ao facto de estas terem sido analisadas um tempo depois da sua preparação, o que levou à sua aglomeração. No que diz respeito ao tamanho, estas apresentaram valores de 80 nm a 129 nm, presenciando-se uma diminuição de tamanho com o aumento da concentração de surfatante, dado que a adsorção deste às moléculas da lenhina, provoca a sua agregação, causando uma contração das nanopartículas, formando agregados mais pequenos. O conteúdo fenólico variou entre $1,50 \times 10^{-6}$ mgGAE/mL e $3,00 \times 10^{-5}$ mgGAE/mL, sendo que o maior valor corresponde à amostra em que não foi adicionado surfatante, verificando-se uma diminuição do conteúdo fenólico com a adição de surfatante.

Posteriormente, ao verificar que as propriedades das nanopartículas eram de fácil alteração, apenas fazendo variar algumas características da sua preparação, foram analisadas quais as condições ótimas de preparação para o método experimental presente na secção 4.3.1, avaliando-se a influência da concentração de lenhina, da concentração de surfatante e do pH no tamanho e no conteúdo fenólico das nanopartículas.

Recorrendo ao software JMP® Pro 16, verificou-se que a concentração de lenhina é o fator que provoca um maior efeito no conteúdo fenólico, seguida do pH, e da concentração de surfatante.

Por outro lado, o pH é o fator com maior relevância no tamanho das partículas, seguido da concentração de surfatante e por último da concentração de lenhina.

A partir da função “Desirability” do JMP® Pro 16, retirou-se que os valores desejáveis para uma minimização do tamanho das nanopartículas e uma maximização do conteúdo fenólico são 422,96 nm e $4,53 \times 10^{-3}$ mgGAE/ml, respectivamente. Estes valores hipotéticos seriam alcançados a partir de uma concentração de lenhina de 35 mg/mL, uma concentração de surfatante de 10 % (m/v lenhina) e com um pH de 5. Foi possível constatar também que o tamanho das partículas aumenta ligeiramente com a concentração de lenhina e de surfatante e diminui drasticamente com o aumento do pH. O conteúdo fenólico e, portanto, a capacidade antioxidante das partículas aumenta drasticamente com a concentração de lenhina e aumenta ligeiramente com a concentração de surfatante e aumento do pH.

A partir de um estudo posterior para analisar a efetiva contribuição de surfatantes nas propriedades de nanopartículas de lenhina, foi verificado que, para o método em estudo, estes compostos químicos não produzem efeitos significativos na morfologia, tamanho, conteúdo fenólico e estabilidade das nanopartículas.

Por último, foram realizados alguns testes para avaliar a existência de atividade antibacteriana por parte das nanopartículas de lenhina sintetizadas contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados demonstraram apenas a ocorrência de uma pequena atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

6.2 Sugestões para futuros trabalhos

Após o desenvolvimento desta dissertação, existem aspetos e alternativas que deveriam ser considerados no seguimento deste projeto, como por exemplo:

- Investigar mais métodos experimentais de síntese de nanopartículas de lenhina, com foco na otimização das suas propriedades e na minimização da utilização de compostos químicos prejudiciais ao ambiente;
- Investigar mais áreas onde estas nanopartículas possam ser aplicadas, contribuindo para a economia circular;
- Realizar estudos adicionais no que diz respeito à atividade antibacteriana das nanopartículas de lenhina, dado que neste trabalho os resultados não foram totalmente claros.

Referências Bibliográficas

- APA (2020). <https://apambiente.pt/residuos/plano-nacional-de-gestao-de-residuos-pngr>, Plano Nacional de Gestão de Resíduos 2030, (Acesso a 1/9/2022)
- APA (2022). <https://apambiente.pt/residuos/subprodutos>, (Acesso a 1/9/2022)
- Angulo, S. C., Zordan, S. E., & John, V. M. (2001). "Desenvolvimento sustentável e a reciclagem de resíduos na construção civil." Seminário Desenvolvimento Sustentável e a Reciclagem na Construção Civil. São Paulo.
- Azadi, P., Inderwildi, O. R., Farnood, R., & King, D. A. (2013). "Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 21, pp. 506–523.
- Bajpai, P. (2010). "Environmentally Friendly Production of Pulp and Paper." John Wiley & Sons, New Jersey
- Bajpai, P. (2015). "Pulp and Paper Industry: Chemicals." Elsevier, London.
- Bajpai, P. (2018). "Biermann's Handbook of Pulp and Paper: Volume 1: Raw Material and Pulp Making." Elsevier, London.
- Barakat, A., Putaux, J.-L., Saulnier, L., Chabbert, B., & Cathala, B. (2007). "Characterization of arabinoxylan-dehydrogenation polymer (synthetic lignin polymer) nanoparticles." *Biomacromolecules*, Vol. 8, pp. 1236–1245
- Beisl, S., Miltner, A., & Friedl, A. (2017). "Lignin from Micro- to Nanosize: Production Methods." *Molecular Sciences*, Vol. 23.
- Burger, L. M., & Richter, H. G. (1991). "Anatomia da Madeira." Nobel, São Paulo.
- Carvalho, M. d. (1999). "Efeito das variáveis de cozimento nas características químicas de pastas kraft de eucalyptus globulus." Tese de doutoramento, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- CELPA. (2020). <http://www.celpe.pt/category/boletins-estatisticos/> (Acesso a 24/8/2022)
- Chen, L., Zhou, X., Shi, Y., Gao, B., Wu, J., Kirk, T. B., . . . Xue, W. (2018). "Green synthesis of lignin nanoparticle in aqueous hydrotropic solution toward broadening the window for its processing and application." *Chemical Engineering Journal*, Vol. 346, pp. 217–225.

- Chio, C., Sain, M., & Qin, W. (2019). "Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 107, pp. 232–249
- Chuck, C. J., Donnelly, J., Parker, H. J., & Jenkins, R. W. (2013). "Renewable biofuel additives from the ozonolysis of lignin." *Bioresource Technology*, Vol. 143, pp. 549–554
- Chung, Y.-L., Olsson, J. V., Li, R. J., Frank, C. W., Waymouth, R. M., Billington, S. L., & Sattely, E. S. (2013). "A Renewable Lignin–Lactide Copolymer and Application in Biobased Composites." *Sustainable Chemistry & Engineering*, Vol. 1, pp. 1231–1238
- Dai, L., Liu, R., Hu, L.-Q., Zou, Z.-F., & Si, C.-L. (2017). "Lignin Nanoparticle as a Novel Green Carrier for the Efficient Delivery of Resveratrol." *Sustainable Chemistry & Engineering*, Vol. 5, pp. 8241–8249
- Deng, Y., Zhao, H., Qian, Y., Lü, L., & Qiu, X. (2016). "Hollow lignin azo colloids encapsulated avermectin with high anti-photolysis and controlled release performance." *Industrial Crops and Products*, Vol. 87, pp. 191–197
- Doherty, W. O., Mousavioun, P., & Fellows, C. M. (2011). "Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers." *Industrial Crops and Products*, Vol. 33, pp. 259–276
- eco.nomia* (2022). <https://economiacircular.gov.pt> (Acesso a 22/8/2022)
- Fatehi, P., & Chen, J. (2020). "Production of Biofuels and Chemicals from Lignin." *Biofuels and Biorefineries*, 6. Springer, Singapore.
- Ferreira, I. (2019). "Preparação e aplicação de membranas de matriz mista para separação da lenhina do licor negro kraft." Tese de mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Ferreira, P. (2000). "Estudo de pastas de KRAFT de *Eucalyptus globulus*: características estruturais e aptidão papeleira." Tese de doutoramento, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Figueiredo, P., Lintinen, K., Hirvonen, J. T., Kostianen, M. A., & Santos, H. A. (2018). "Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications." *Progress in Materials Science*, Vol. 93, pp. 233–269
- Figueiredo, P., Lintinen, K., Kiriazis, A., Hynninen, V., Liu, Z., & Santos, H. A. (2017). "In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells." *Biomaterials*, Vol. 121, pp. 97–108
- Frangville, C., Rutkevičius, M., Richter, A. P., Velev, P. O., Stoyanov, P. S., & Paunov, D. V. (2012). "Fabrication of environmentally biodegradable lignin nanoparticles." *ChemPhysChem*, Vol. 13, pp. 4235–4243.

- Galkin, D. M., & Samec, D. J. (2016). "Lignin Valorization through Catalytic Lignocellulose Fractionation: A Fundamental Platform for the Future Biorefinery." *ChemSusChem*, Vol. 9, pp. 1544–1558
- Gao, W., & Fatehi, P. (2019). "Lignin for polymer and nanoparticle production: Current status and challenges." *Canadian journal of chemical engineering*, Vol. 97, pp. 2827–2842
- Ge, Y., Wei, Q., & Li, Z. (2014). "Preparation and Evaluation of the Free Radical Scavenging Activities of Nanoscale Lignin Biomaterials." *BioResources*, Vol. 9, pp. 6699–6706
- Gilca, I. A., Crestini, C., & I.Popa, V. (2015). "Obtaining lignin nanoparticles by sonication." *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 23, pp. 369–375
- Gosselink, R. J., Snijder, M. H., Kranenbarg, A., Keijsers, E. R., & Stigsson, E. d. (2004). "Characterisation and application of NovaFiber lignin." *Industrial Crops and Products*, Vol. 20, pp. 191–203
- Guo, X., Huang, H., Wu, Y., & Zhang, S. (2008). "Adsorption of chromium(III) on lignin." *Bioresource Technology*, Vol. 99, pp. 7709–7715
- Guo, X., Zhang, S., & Shan, X.-q. (2008). "Adsorption of metal ions on lignin." *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 151, pp. 134–142
- Gupta, A. K., Mohanty, S., & Nayak, S. K. (2015). "Influence of addition of vapor grown carbon fibers on mechanical, thermal and biodegradation properties of lignin nanoparticle filled bio-poly(trimethylene terephthalate) hybrid nanocomposites." *RSC Advances*, Vol. 5, pp. 56028–56036
- Haq, I., Mazumder, P., & Kalamdhad, A. S. (2020). "Recent advances in removal of lignin from paper industry wastewater and its industrial applications – A review." *Bioresource Technology*, Vol. 312, p. 123636
- Iravani, S., & Varma, R. S. (2020). "Greener synthesis of lignin nanoparticles and their applications." *Green Chemistry*, Vol. 22, pp. 612–636
- Jiang, C., He, H., Jiang, H., Ma, L., & Jia, D. M. (2013). "Nano-lignin filled natural rubber composites: Preparation and characterization." *eXPRESS Polymer Letters*, Vol. 7 pp. 480–493.
- Kevlich, N. S., Shofner, M. L., & Nair, S. (2017). "Membranes for Kraft black liquor concentration and chemical recovery: Current progress, challenges, and opportunities." *Separation Science and Technology*, Vol. 52, pp. 1070–1094

- Kim, S., Fernandes, M. M., Matamá, T., & Loureiro, A. (2013). "Chitosan–lignosulfonates sono-chemically prepared nanoparticles: Characterisation and potential applications." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 103, pp. 1–8
- Lancefield, C. S., Panovic, I., Deus, P. J., Bartac, K., & Westwood, N. J. (2017). "Pre-treatment of lignocellulosic feedstocks using biorenewable alcohols: towards complete biomass valorization." *Green Chemistry*, Vol. 19, pp. 202–214
- Li, H., Deng, Y., Liu, B., Ren, Y., Liang, J., Qian, Y., . . . Li, C. (2016). "Preparation of Nanocapsules via the Self-Assembly of Kraft Lignin: A Totally Green Process with Renewable Resources." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, Vol. 4, pp. 1946–1953
- Li, Y., Qiu, X., Qian, Y., Xiong, W., & Yang, D. (2017). "pH-responsive lignin-based complex micelles: Preparation, characterization and application in oral drug delivery." *Chemical Engineering Journal*, Vol. 327, pp. 1176–1183
- Li, Y., Zhou, M., Pang, Y., & Qiu, X. (2017). "Lignin-Based Microsphere: Preparation and Performance on Encapsulating the Pesticide Avermectin." *Sustainable Chemistry & Engineering*, Vol. 5, pp. 3321–3328
- Li, Z., Wan, L., & Ge, Y. (2015). "Fabrication of a green porous lignin-based sphere for the removal of lead ions from aqueous media." *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 285, pp. 77–83
- Liao, J. J., Latif, N. H., Trache, D., & Brosse, N. (2020). "Current advancement on the isolation, characterization and application of lignin." *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 162, pp. 985–1024
- Lievonen, M., Valle-Delgado, J. J., Mattinen, M.-L., Hult, E.-L., Lintinen, K., Kostianen, M. A., . . . Setälä, H. (2016). "A simple process for lignin nanoparticle preparation." *Green Chemistry*, Vol. 18, pp. 1416–1422
- Liitiä, T. M., Maunu, S. L., Hortling, B., Toikka, M., & Kilpeläinen, I. (2003). "Analysis of Technical Lignins by Two- and Three-Dimensional NMR Spectroscopy." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, pp. 2136–2143
- Lintinen, K., Latikka, M., Sipponen, M. H., Ras, R. H., Österberg, M., & Kostianen, M. A. (2016). "Structural diversity in metal–organic nanoparticles based on iron isopropoxide treated lignin." *RSC Advances*, Vol. 6, pp. 31790–31796
- Lisboa, S. (2008). "Dissolução e precipitação de xilanas durante o cozimento Kraft de E. globulus." Tese de doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro.

- Lu, Q., Zhu, M., Zu, Y., Liu, W., Yang, L., & Zhang, Y. (2012). "Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin." *Food Chemistry*, Vol. 135, pp. 63–67
- Machado, L. M. (2002). "Valorização de Resíduos de Natureza Fibrosa do Processo Kraft de Produção de Pastas de Eucalipto.", Tese de doutoramento, Universidade da Beira Alta, Covilhã.
- Marques, J. (2013). "Geopolimerização de cinzas e dregs da indústria da pasta de papel." Dissertação de mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Matias, D. (2012). "Análise do potencial de valorização dos resíduos de Licor Verde da Indústria de Pasta de Papel." Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Modolo, R. (2006). "Valorização de resíduos do sector de pasta e papel em produtos da construção civil." Dissertação de mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Mourão, P. A., Carrott, M. M., & Carrott, P. J. (2006). "Controlling the micropore size of activated carbons for the treatment of fuels and combustion gases." *Applied Surface Science*, Vol. 252, pp. 5953–5956
- Myint, A. A., Lee, H. W., Seo, B., Son, W.-S., Yoon, J., Yoon, T. J., . . . Lee, Y.-W. (2016). "One pot synthesis of environmentally friendly lignin nanoparticles with compressed liquid carbon dioxide as an antisolvent." *Green Chemistry*, Vol. 18, pp. 2129–2146
- Namane, M. (2016). "Precipitation and valorisation of lignin obtained from south african kraft mill black liquor." Tese de doutoramento. University of Cape Town, Cape Town.
- Oliveira, V. (2009). "Valorização de Resíduos da Indústria da Pasta e Papel– Compostagem e Aplicação do composto no Solo." Dissertação de mestrado, Universidade do Algarve, Algarve.
- Pang, Y., Wang, S., Qiu, X., Luo, Y., Lou, H., & Huang, J. (2017). "Preparation of Lignin/Sodium Dodecyl Sulfate Composite Nanoparticles and Their Application in Pickering Emulsion Template-Based Microencapsulation." *Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 65, pp. 11011–11019
- Pavaneli, G. (2020). "Produção e caracterização de nanopartículas de lignina extraída de eucalipto pelo processo LignoBoost." Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Pereira, A. (2016). "Caraterização e valorização do licor negro da indústria da pasta de papel ao sulfito." Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto.

- Pereira, H. (1988). "Variability in The Chemical Composition of Plantation Eucalypts." *Wood and Fiber Science*, Vol. 20, pp. 82–90
- Pinheiro, C. T., Pais, R. F., Quina, M. J., & Gando-Ferreira, L. M. (2018). "Regeneration of waste lubricant oil with distinct properties by extraction-flocculation using green solvents." *Journal of Cleaner Production*, Vol. 200, pp. 578-587
- Prinsen, P., Rencoret, J., Gutierrez, A., Liitia, T., Tamminen, T., & Colodette, J. L. (2013). "Modification of the Lignin Structure during Alkaline Delignification of Eucalyptus Wood by Kraft, Soda-AQ, and Soda-O2 Cooking." *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 52, pp. 15702–15712.
- Qian, Y., Deng, Y., Qiu, X., Lia, H., & Yang, D. (2014). "Formation of uniform colloidal spheres from lignin, a renewable resource recovered from pulping spent liquor." *Green Chemistry*, Vol. 16, pp. 2156–2163
- Qian, Y., Qiu, X., Zhong, X., Zhang, D., Deng, Y., Yang, D., & Zhu, S. (2015). "Lignin Reverse Micelles for UV-Absorbing and High Mechanical Performance Thermoplastics." *Ind. Eng. Chem. Res*, Vol. 54, pp. 12025–12030
- Qian, Y., Zhang, Q., Qiu, X., & Zhu, S. (2014). "CO₂-responsive diethylaminoethyl-modified lignin nanoparticles and their application as surfactants for CO₂/N₂-switchable Pickering emulsions." *Green Chemistry*, Vol. 16, pp. 4963–4968
- Rahman, O. u., Shi, S., Ding, J., Wang, D., Ahmad, S., & Yu, H. (2018). "Lignin nanoparticles: synthesis, characterization and corrosion protection performance." *New Journal of Chemistry*, Vol. 42, pp. 3415–3425.
- Ralph, J., Brunow, G., & Boerjan, W. (2007). "Lignins." *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1–10
- Ramadan, A. N., Abuknesha, A., & Price, R. G. (2002). "Removal of detergents from protein extracts using activated charcoal prior to immunological analysis." *Journal of Immunological Methods*, Vol. 254, pp. 37-43
- Reis, C. (2017). "Análise da utilização dos subprodutos da Indústria de Pasta, de Papel e de Cartão portuguesa, na ótica dos princípios de economia circular e da promoção da competitividade do setor." Dissertação de mestrado, Instituto Universitário de Lisboa, Lisboa.
- Reis, H. M., Silva, R. J., & Macedo, J. C. (2012). "Análise exergética da caustificação do licor verde para a preparação do licor de cozimento do processo kraft de extração de celulose." XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química.

- Richter, A. P., Bharti, B., Armstrong, H. B., Brown, J. S., Plemmons, D., & Paunov, V. N. (2016). Synthesis and Characterization of Biodegradable Lignin Nanoparticles with Tunable Surface Properties. *Langmuir*, Vol. 32, pp. 6468–6477
- Rocha, D. (2018). "Valorização de resíduos na indústria de pasta de papel." Relatório de mestrado, Escola Superior Agrária de Coimbra, Coimbra.
- Rodríguez-Mirasol, J., T.Cordero, & Rodriguez, J. J. (1993). "Activated Carbons from CO₂ Partial Gasification of Eucalyptus Kraft Lignin." *Energy & Fuels*, pp. 133–138
- Saiz-Jimenez, C., & Leeuw, J. W. (1986). "Lignin Pyrolysis Products: Their Structures and Their Significance as Biomarkers." *Organic Geochemistry*, Vol. 10, pp. 869–876
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2008). "Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method." *Food Chemistry*, Vol. 112, pp. 654–658
- Schneider, W. D., Dillon, A. J., & Camassola, M. (2021). "Lignin nanoparticles enter the scene: A promising versatile green tool for multiple applications." *Biotechnology Advances*.
- Setua, D. K., Shukla, M. K., Nigam, V., Singh, H., & Mathur, G. N. (2004). "Lignin reinforced rubber composites." *Polymer composites*, Vol. 21, pp. 988–995
- Simões, A. (2021). "Precipitation of lignin and hemicelluloses from black liquor: a route towards their valorization." Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Souza¹, A. V., Vieira, M. R., & Putti, F. F. (2018). "Correlações entre compostos fenólicos e atividade antioxidante em casca e polpa de variedades de uva de mesa." *Brazilian Journal of Food Technology*, Vol. 21,
- Systems, P. Q. (2022). <https://www.pqsystems.com/qualityadvisor> (Acesso a 22/8/2022) Quality Advisor, Pareto Diagram.
- Tang, Q., Qian, Y., Yang, D., Qiu, X., Qin, Y., & Zhou, M. (2020). "Lignin-Based Nanoparticles: A Review on Their Preparations and Applications.
- Tang, Q., Zhou, M., Li, Y., Qiu, X., & Yang, D. (2017). "Formation of Uniform Colloidal Spheres Based on Lignosulfonate, a Renewable Biomass Resource Recovered from Pulp Spent Liquor." *ACS Sustain. Chem. Eng.*, Vol. 6, pp. 1379–1386.
- Tejado, A., Peña, C., Labidi, J., Echeverria, J. M., & Mondragon, I. (2007). "Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis." *Bioresource Technology*, Vol. 98, pp. 1655–1663

- Torre, M. J., Moral, A., Hernández, M. D., Cabeza, E., & AntonioTijero. (2013). "Organosolv lignin for biofuel." *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 45, pp. 58–63
- Vakkilainen, E. K., & Tran, H. (2015). "The Kraft Chemical Recovery Process." *Research Gate*, Vol. 1.
- Valgimigli, L., Baschieri, A., & Amorati, R. (2018). "Antioxidant activity of nanomaterials." *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 6, pp. 2036–2051
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., & Rinaudo, M. (2012). "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)." *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 84, pp. 377–410
- Wang, B., Sun, D., Wang, H.-M., Yuan, T.-Q., & Sun, R.-C. (2018). "Green and Facile Preparation of Regular Lignin Nanoparticles with High Yield and Their Natural Broad-Spectrum Sunscreens." *Sustainable Chemistry & Engineering*, Vol. 7, pp. 2658–2666
- Yan, Z., Liao, G., Zou, X., Zhao, M., Wu, T., Chen, Y., & Fang, G. (2020). "Size-Controlled and Super Long-Term Stable Lignin Nanospheres through a Facile Self-Assembly Strategy from Kraft Lignin." *Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 68, pp. 8341–8349
- Yang, W., Fortunati, E., Gao, D., Balestra, G. M., Giovanale, G., He, X., . . . Puglia, D. (2018). "Valorization of Acid Isolated High Yield Lignin Nanoparticles as Innovative Antioxidant/Antimicrobial Organic Materials." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, Vol. 6, pp. 3502–3514
- Yearla, S. R., & Padmasree, K. (2015). "Preparation and characterisation of lignin nanoparticles: evaluation of their potential as antioxidants and UV protectants." *Journal of Experimental Nanoscience*, Vol. 11, pp. 289–302
- Yiamsawas, D., Baier, G., Thines, E., Landfester, K., & Wurm, F. R. (2014). "Biodegradable lignin nanocontainers." *RSC Advances*, Vol. 4, pp. 11661–11663
- Zhong, X., Qian, Y., Huang, J., Yang, D., Deng, Y., & Qiu, X. (2016). "Fabrication of Lignosulfonate Vesicular Reverse Micelles to Immobilize Horseradish Peroxidase." *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 55, pp. 2731–2737
- Zhou, Y., Qian, Y., Wang, J., Qiu, X., & Zeng, H. (2020). "Bioinspired Lignin-Polydopamine Nanocapsules with Strong Bioadhesion for Long-Acting and High-Performance Natural Sunscreens." *Biomacromolecules*, Vol. 21, pp. 3231–3241
- Zikeli, F., Vinciguerra, V., D'Annibale, A., Capitani, D., Romagnoli, M., & Mugnozza, G. S. (2019). "Preparation of lignin nanoparticles from wood waste for wood surface treatment." *Nanomaterials*, Vol. 9, pp. 281

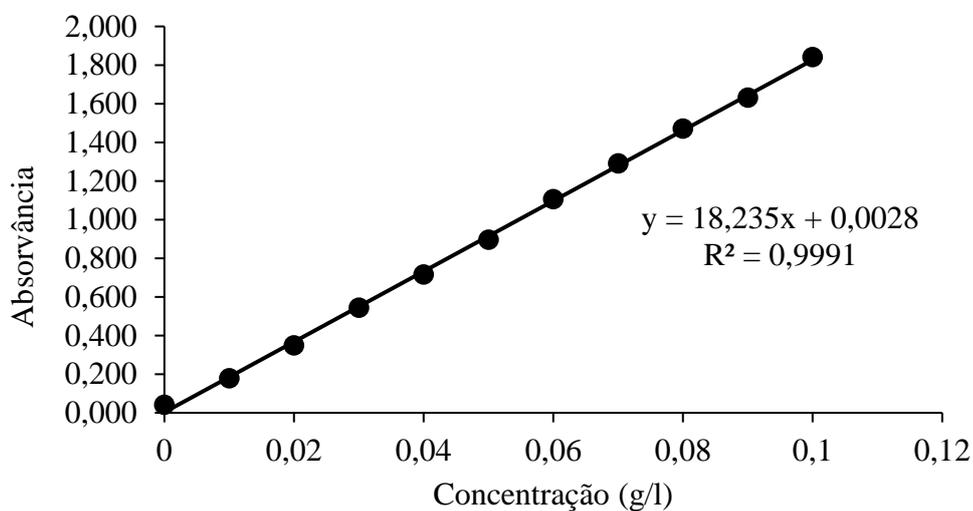
ANEXO A – Curvas de calibração

Figura A.1 – Curva de calibração para testar a concentração de lenhina na solução de etanol do primeiro procedimento de *self-assembly* da secção 4.2.1.

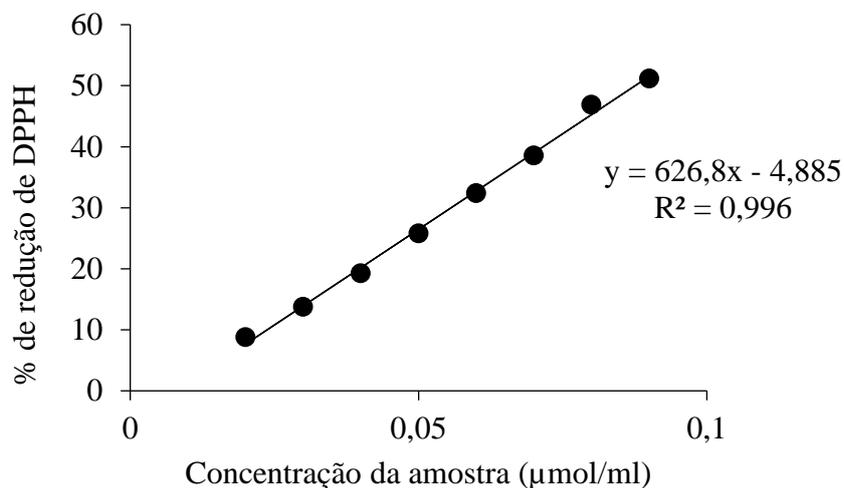


Figura A.2 – Curva de calibração para a determinação da concentração das amostras.