

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Carolina Marquezan da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO DA
PALHA DE MILHO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Santa Maria, RS
2022

Carolina Marquezan da Silva

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO DA PALHA DE MILHO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi

Santa Maria, RS
2022

Silva, Carolina Marquezan
Desenvolvimento de Processo de Deslignificação da
Palha de Milho Assistida por Ultrassom / Carolina
Marquezan Silva.- 2022.
75 p.; 30 cm

Orientador: Cezar Augusto Bizzi
Coorientador: Ayrton Figueiredo Martins
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Deslignificação 2. Valorização 3. Biomassa 4.
Ultrassom I. Augusto Bizzi, Cezar II. Figueiredo
Martins, Ayrton III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, CAROLINA MARQUEZAN SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Carolina Marquezan da Silva

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO DA PALHA DE MILHO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química Analítica**.

Aprovado em 20/05/2022

Cezar Augusto Bizzi, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

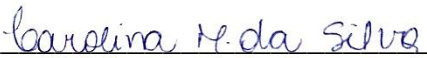
Adilson Ben da Costa, Dr. (UNISC)

Fernanda de Castilhos, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim, e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta dissertação (ou parte dela) não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.



Carolina Marquezan da Silva

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro por meio da bolsa de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi** pela orientação neste trabalho, pelo exemplo profissional e pessoal, pela oportunidade de discutir as atividades desenvolvidas durante o mestrado e pela confiança, paciência, amizade e aprendizados.

Aos participantes da banca examinadora **Profs. Drs. Adilson Ben da Costa e Fernanda de Castilhos**, pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas sugestões e contribuições feitas para o aprimoramento deste trabalho.

A todos os colegas do **LAQIA/CEPETRO** pelo convívio, amizade e colaboração nesta trajetória. Em especial, à **Karen Giacobe, Elenice A. Wulf e Jennifer S. Correa** pela amizade, disponibilidade e auxílio na execução deste trabalho.

Agradeço à minha família, especialmente meus pais **Cézar e Luciana**, que sempre incentivaram e apoiaram minhas decisões e não mediram esforços para que eu tivesse todo suporte necessário nos meus estudos.

Agradeço a companhia, torcida e compreensão dos amigos que estiveram comigo desde o início e aos que conquistei durante este período.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE DESLIGNIFICAÇÃO DA PALHA DE MILHO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

AUTORA: Carolina Marquezan da Silva
ORIENTADOR: Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi

Nesse trabalho foi investigada a utilização do ultrassom (US) no processo de hidrólise ácida para deslignificação da palha de milho, em comparação com o método convencional proposto pelo Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL, Estados Unidos). Esse procedimento consiste na hidrólise de 300 mg de amostra com H₂SO₄ (72%) por 1 hora a 30 °C, posterior diluição a 4% de H₂SO₄ e autoclavagem por 1 hora a 121 °C. Para o processo de hidrólise ácida assistida por ultrassom foram avaliados banhos ultrassônicos com diferentes frequências (25 a 130 kHz), potências nominais (100 a 330 W) e amplitudes (50 a 100%). Para comparação dos resultados, foi feito o processo de hidrólise com ultrassom utilizando as mesmas condições de tempo, temperatura e concentração ácida que o método convencional (NREL). Após a escolha do sistema ultrassônico mais adequado, foram avaliados parâmetros de processo, tais como: tempo de sonicação, tempo de autoclave e amplitude do ultrassom. Após a otimização dos parâmetros de processo, a condição mais adequada para a hidrólise ácida assistida por ultrassom para a deslignificação da palha de milho foi de 35 kHz por 10 minutos, 100% de amplitude, 30 °C, solução de H₂SO₄ 72% e 60 minutos de hidrólise em autoclave. Para verificar se a hidrólise ácida havia solubilizado todos os carboidratos da palha de milho, foi feita a determinação de glicose, xilose e arabinose por HPLC-RID na fração solúvel do método convencional e do método alternativo com o US. Para a hidrólise seguindo o proposto pelo NREL e para a condição otimizada com o US, foram obtidos os teores de 86,68% e 91,67% de carboidratos, respectivamente. Os resultados referentes à extração de lignina e de solubilização dos carboidratos para ambos os métodos não apresentou diferença significativa, segundo o teste estatístico *t student* em intervalo de 95% de confiança. Adicionalmente, foi feita a caracterização dos grupos funcionais e análise morfológica da lignina resultante do processo de hidrólise ácida por espectroscopia de infravermelho (IR) e microscopia eletrônica de varredura (SEM). O processo proposto permitiu deslignificação da palha de milho em condições brandas de temperatura, utilizando ácido diluído e menores tempos de extração quando comparado ao método convencional.

Palavras chave: Deslignificação. Valorização. Biomassa. Ultrassom.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ULTRASOUND-ASSISTED CORN STRAW DELIGNIFICATION PROCESS

AUTHOR: Carolina Marquezan da Silva
ADVISOR: Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi

In this work, the ultrasound (US) was investigated in acid hydrolysis process for corn straw delignification, in comparison with the conventional process proposed by National Renewable Energy Laboratory (NREL). This procedure consists in 300 mg of corn straw hydrolysis with 72% H₂SO₄ for 1 hour at 30 °C, followed by a dilution at 4% acid, and autoclaving for 1 hour at 121 °C. For the ultrasound-assisted acid hydrolysis process it was evaluated ultrasonic baths in several conditions of frequencies (25 to 130 kHz), nominal power (100 to 330 W), and amplitudes (50 to 100%). This procedure was performed in the same conditions of time, temperature, and acid concentration as the reference method (NREL). After the selection of the most efficient ultrasonic system, other parameters were evaluated, as sonication time, ultrasonic amplitude, and autoclaving time. The more suitable conditions for corn straw delignification were achieved in 10 minutes of sonication at 35 kHz and 50% of amplitude, 72% H₂SO₄ at 30 °C followed by 60 minutes of autoclaving. To verify if the acid hydrolysis solubilized all the carbohydrates in the corn straw, the contents of glucose, xylose, and arabinose were determined by HPLC-RID. The total carbohydrate content of 86.68% was obtained for the reference method (NREL), while 91.67% was recovered when the proposed method with US was used. The results referring to lignin extraction and carbohydrate solubilization for both methods exhibit no significant difference, according to the t student statistical test (95% confidence level). Additionally, the characterization of the functional groups and morphological analysis of the lignin resulting from the acid hydrolysis process was carried out by infrared spectroscopy (IR) and scanning electron microscopy (SEM), respectively. The proposed ultrasound-assisted delignification process allowed the delignification of corn straw under mild temperature conditions and reduced extraction time when compared to the conventional method.

Keywords: Delignification. Valorization. Biomass. Ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Constituição monomérica da parede vegetal da palha de milho.....	16
Figura 2 -	Estrutura molecular da hemicelulose.....	17
Figura 3 -	Parede celular com destaque para a ligação entre carboidratos e a lignina.....	18
Figura 4 -	Unidades formadoras da lignina.....	19
Figura 5 -	Representação dos componentes de um banho ultrassônico.....	29
Figura 6 -	Medição da intensidade do ultrassom com folha de alumínio para banhos ultrassônicos operando em 1b) 25 kHz; 1c) 45 kHz; 2b) 37 kHz; 2c) 80 kHz; 3b) 35 kHz e 3c) 130 kHz.....	46
Figura 7 -	Banhos ultrassônicos com frequências de a) 25 e 45 kHz; b) 37 e 80 kHz e c) 35 e 130 kHz.....	47
Figura 8 -	Teores de lignina e valores de densidade de potência em cada frequência de US (média \pm desvio padrão, n = 3).....	51
Figura 9 -	Avaliação do tempo de hidrólise com banhos de 25 e 35 kHz com 50% de amplitude na deslignificação da palha de milho (média \pm desvio padrão, n = 3).....	52
Figura 10 -	Avaliação dos tempos de autoclavagem na extração de lignina em 10 minutos de hidrólise com 35 kHz e 50% de amplitude (média \pm desvio padrão, n = 3).....	55
Figura 11 -	Avaliação dos tempos de autoclavagem na extração de lignina em 10 minutos de hidrólise com 35 kHz e 75% de amplitude (média \pm desvio padrão, n = 3).....	57
Figura 12 -	Avaliação dos tempos de autoclavagem na extração de lignina em 10 minutos de hidrólise com 35 kHz e 100% de amplitude (média \pm desvio padrão, n = 3).....	59
Figura 13 -	Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) obtidos para a lignina em a) 10 minutos de hidrólise com 35 kHz e 100% amplitude e 60 minutos de autoclave e b) NREL.....	62
Figura 14 -	Microscopia eletrônica de varredura para a) palha de milho in natura, b) palha de milho livre de extrativos e c) lignina após hidrólise ácida (NREL).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Métodos de deslignificação de biomassas lignocelulósicas.....	24
Tabela 2 -	Métodos de deslignificação assistida por ultrassom de biomassas lignocelulósicas.....	30
Tabela 3 -	Condições cromatográficas empregadas nas determinações de açúcares por HPLC-RID.....	38
Tabela 4 -	Caracterização da palha de milho in natura e livre de extrativos determinados com base na norma do NREL (média \pm desvio padrão, n = 3).....	42
Tabela 5 -	Condições operacionais dos banhos ultrassônicos utilizados.....	47
Tabela 6 -	Teores de lignina obtidos com banhos ultrassônicos operando em 50% de amplitude e com o procedimento padrão (NREL) (média \pm desvio padrão, n = 3).....	48
Tabela 7 -	Valores de potência nominal, potência dissipada e densidade de potência nos banhos de ultrassom com amplitude de 50%.....	50
Tabela 8 -	Avaliação da produção de açúcares em diferentes tempos de autoclavagem e 50% de amplitude na hidrólise (média \pm desvio padrão, n = 3).....	56
Tabela 9 -	Avaliação da produção de açúcares em diferentes tempos de autoclavagem e 75% de amplitude na hidrólise (média \pm desvio padrão, n = 3).....	58
Tabela 10 -	Avaliação da produção de açúcares em diferentes tempos de autoclavagem e 100% de amplitude na hidrólise (média \pm desvio padrão, n = 3).....	59
Tabela 11 -	Teor de lignina após hidrólise com H ₂ SO ₄ a 54% (média \pm desvio padrão, n = 3).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância, do inglês <i>Analysis of Variance</i>
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
FEG	Canhão por emissão de campo, do inglês <i>Field Emission Gun</i>
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
HPLC-RID	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography Refractive Index Detector</i>
IR	Espectroscopia no infravermelho, do inglês <i>Infrared Spectroscopy</i>
NREL	Laboratório Nacional de Energias Renováveis, dos Estados Unidos, do inglês <i>National Renewable Energy Laboratory</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno, do inglês <i>Polyvinylidene Fluoride</i>
PZT	Titanato Zirconato de Chumbo, do inglês <i>Lead Zirconate Titanate</i>
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i>
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
US	Ultrassom
VP	Pressão variável, do inglês <i>Variable Pressure</i>
VPSE	Elétrons Secundários em Pressão Variável, do inglês <i>Secondary Electrons at Variable Pressure</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO GERAL	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA VEGETAL	15
3.1.1 Celulose	15
3.1.2 Hemicelulose	16
3.1.3 Lignina	17
3.1.4 Extrativos	19
3.1.5 Materiais Inorgânicos.....	20
3.2 VALORIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	20
3.3 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO DE LIGNINA	22
3.4 ULTRASSOM	25
3.4.1 Fundamentos	25
3.4.2 Fatores que afetam a cavitação	26
3.4.3 Reatores sonoquímicos	28
3.4.4 Deslignificação assistida por ultrassom	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	31
4.2 REAGENTES.....	32
4.3 PROCEDIMENTOS	32
4.3.1 Teor de umidade.....	32
4.3.2 Teor de cinzas	33
4.3.3 Teor de proteínas	34

4.3.4 Remoção de extrativos	35
4.3.5 Hidrólise ácida	36
4.3.6 Teor de lignina solúvel	36
4.3.7 Teor de lignina insolúvel e total	37
4.3.8 Quantificação de carboidratos	38
4.3.9 Mapeamento dos banhos de ultrassom	38
4.3.10 Deslignificação assistida por ultrassom	39
4.3.11 Calorimetria	40
4.3.12 Caracterização por FT-IR	41
4.3.13 Caracterização por SEM	41
5 RESULTADOS	42
5.1 ANÁLISE COMPOSICIONAL DA PALHA DE MILHO	42
5.2 MAPEAMENTO DOS BANHOS ULTRASSÔNICOS	45
5.3 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA ULTRASSÔNICA	46
5.4 TESTE CALORIMÉTRICO	49
5.5 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE ASSISTIDA POR ULTRASSOM	51
5.6 AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE ULTRASSÔNICA E TEMPO DE AUTOCLAVE ..	55
5.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÁCIDA	60
5.8 CARACTERIZAÇÃO POR FT-IR	61
5.9 CARACTERIZAÇÃO POR SEM	63
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

Biomassa é considerada qualquer material, ou rejeito sustentável, que seja uma fonte rica em carbono e com potencial para gerar produtos de maior valor agregado quando submetida à tratamentos físico-químicos ou biológicos (CHERUBINI;STRØMMAN, 2011). A palha de milho é caracterizada como um resíduo industrial, o que a torna uma matéria prima barata e abundante para aplicação em processos de conversão, além de ser uma fonte renovável alternativa ao uso de combustíveis fósseis para a produção de energia e produtos da química fina (YANG *et al.*, 2018).

Métodos de extração são frequentemente empregados com a finalidade de valorizar resíduos lignocelulósicos. O objetivo desse tratamento é fragmentar as cadeias de celulose, hemicelulose e lignina em frações de menor peso molecular que possuem maior valor agregado do que as suas formas poliméricas, ou apenas separá-las visando a geração de energia. A lignina, por exemplo, ao ser retirada da matriz lignocelulósica pode ser utilizada para funcionalização de polímeros em compósitos, oferecendo resistência e leveza ao material (BHUSHAN *et al.*, 2020; NARRON *et al.*, 2016). Também pode ser empregada na geração de combustíveis e na aditivação dos mesmos (JEDRZEJCZYK *et al.*, 2021; OBYDENKOVA *et al.*, 2017). Se os tratamentos promoverem a fragmentação da estrutura da lignina em monômeros, são obtidos produtos de interesse para indústria farmacêutica e alimentícia.

Como exemplos de métodos convencionais de separação ou fragmentação da lignina podem ser citados a pirólise, hidrólise ácida e alcalina, processos organossolv, liquefação hidrotérmica, entre outros (DEVADASU *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2015). Entretanto, esses processos demandam elevadas quantidades de energia devido à necessidade de aquecimento dos sistemas e o longo tempo de reação, além de consumo de reagentes concentrados durante os experimentos. Por essa razão, processos alternativos são uma opção para economia de recursos e de conservação ou, até mesmo, o aumento de eficiência do processo. A energia ultrassônica tem sido amplamente utilizada na intensificação de processos devido a ocorrência de fenômenos acústicos que minimizam os inconvenientes citados anteriormente.

Dessa forma, o presente trabalho propõe um estudo das otimizações de parâmetros operacionais do ultrassom que beneficie a extração da lignina da palha de milho em condições reacionais brandas, quando comparadas à métodos convencionais. A fim de avaliar a eficiência da deslignificação, o método proposto no presente estudo foi comparado com um método convencional desenvolvido pelo Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL, do inglês *National Renewable Energy Laboratory*) pertencente ao Departamento de Energia dos Estados Unidos. Foram avaliados tempo de extração e concentração de ácido sulfúrico, além da frequência e amplitude do ultrassom.

Cabe destacar que este estudo possibilitou propor um método que pode ser utilizado como processo para a extração de lignina em escala laboratorial, visto que foi observada redução no tempo de extração, ocasionando em economia de recursos. Embora o aumento de escala não tenha sido avaliado, a deslignificação assistida por ultrassom se torna uma possibilidade na modificação de processos mais morosos e custosos empregados industrialmente no pré-tratamento da biomassa. Além desta abordagem, o método proposto também pode ser utilizado como alternativa aos métodos analíticos convencionais de determinação de lignina, visto que os valores de ambos os métodos não tiveram diferença significativa quando submetidos ao teste estatístico *t student* com intervalo de 95% de confiança.

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da energia ultrassônica para a extração de lignina visando a valorização da palha de milho.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o método de deslignificação assistido por ultrassom com o método convencional estabelecido pelo NREL (Laboratório Nacional de Energias Renováveis);
- Avaliar a influência da etapa de hidrólise ácida assistida por US a partir da quantificação de açúcares fermentescíveis por HPLC-RID;
- Caracterizar a fração de lignina obtida com o método convencional e o método proposto com as técnicas de FT-IR e SEM.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aumento da demanda energética mundial tem causado inúmeros impactos ambientais e econômicos que geram preocupações a curto e longo prazo. A escassez de recursos energéticos, elevado custo de obtenção e comercialização de combustíveis fósseis, bem como o aumento das emissões de gases de efeito estufa, são alguns deles (ABDEL DAIEM *et al.*, 2022).

Nesse sentido, estudos têm sido realizados com o objetivo de implementar o uso de biomassas vegetais em substituição às fontes de origem fósseis na produção de combustíveis, resinas e outros produtos da química fina.

Uma das vantagens do uso destas fontes renováveis está na possibilidade da reciclagem do gás carbônico emitido durante combustão, uma vez que a biomassa absorve o CO₂ atmosférico no processo de fotossíntese. Portanto, assume-se que a quantidade de CO₂ gerado na queima da biomassa é a mesma necessária para prover o ciclo energético da planta durante seu crescimento, havendo um equilíbrio entre emissão e absorção de poluentes (CHERUBINI;PETERS; *et al.*, 2011). O mesmo não é observado com fontes fósseis, visto que o CO₂ introduzido na atmosfera pela combustão não é consumido pelos animais e plantas a tempo de gerar mais combustível fóssil. Logo, essa emissão não é contabilizada no atual ciclo do carbono e torna-se um excedente prejudicial para o ambiente.

Uma das culturas agrícolas que geram resíduos lignocelulósicos é o plantio do milho, que corresponde a 37% da produção de grãos anual do país, ficando atrás somente da soja (52%) (CONAB, 2018). De acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), cerca de 102 mil toneladas de milho foram produzidas no Brasil na safra de 2019/2020 (CONAB). O grão de milho é amplamente empregado no consumo humano, animal e industrial, e uma parcela da produção é designada para exportação. Já o sabugoe a palha de milho não têm finalidades específicas além do aproveitamento da palha para recobrir o solo usado para o cultivo. Portanto, grande parte dessa biomassa lignocelulósica é destinada para a queima e geração de energia, visto que não há uma rota dedicada à valorização desse resíduo (ZHANG *et al.*, 2022).

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA VEGETAL

A biomassa lignocelulósica, de uma forma geral, é composta por 3 biopolímeros principais: celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%), lignina (5-30%) e constituintes minoritários como materiais inorgânicos e extrativos (GU *et al.*, 2021).

Para a conversão efetiva desses carboidratos (fração celulósica e hemicelulósica) em açúcares monoméricos e valorização dos mesmos, é necessário reduzir ou superar a recalcitrância da biomassa. A recalcitrância da biomassa é definida como a resistência natural das paredes celulares das plantas à sua conversão biológica causada principalmente pela complexidade e heterogeneidade da biomassa (ZOGHLAMI *et al.*, 2019). Estes atributos impedem a conversão dos polissacarídeos pelas enzimas pois atuam como uma barreira física na parede celular das biomassas.

Fatores que limitam a acessibilidade de enzimas estão frequentemente relacionados com a composição química das frações majoritárias, peso molecular da lignina, cristalinidade e grau de polimerização da celulose (YOO *et al.*, 2020).

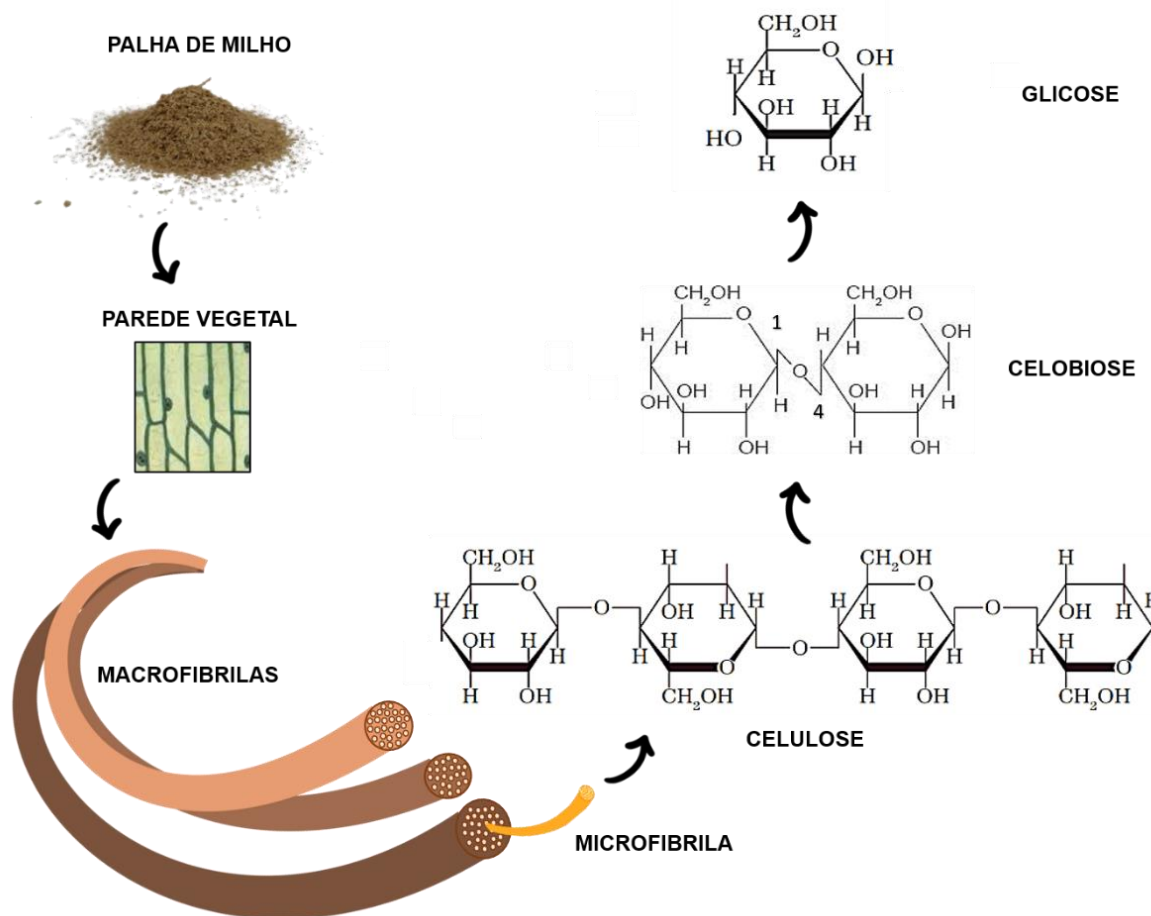
3.1.1 Celulose

A celulose é um polímero de cadeia linear, formada por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1-4). Como representado na Figura 1, duas unidades de glicose ligam-se uma à outra eliminando uma molécula de água, dando origem a celobiose, unidade repetitiva da celulose (MANO *et al.*, 2013).

É a constituinte majoritária da biomassa e a organização das cadeias celulósicas nas plantas, além das ligações de hidrogênio entre microfibrilas, confere cristalinidade à parede celular, permitindo que a mesma seja compacta e resistente à degradação enzimática e ataques químicos (BRODEUR *et al.*, 2011).

O tipo de fonte da natureza tem grande influência no grau de polimerização e no tamanho das cadeias celulósicas da biomassa. No geral, as microfibrilas constituídas das unidades monoméricas da celulose agrupam-se e formam as macrofibrilas, que se unem para darem origem à fibra da celulose, como ilustrado na Figura 1 (MANO *et al.*, 2013).

Figura 1 - Constituição monomérica da parede vegetal da palha de milho.



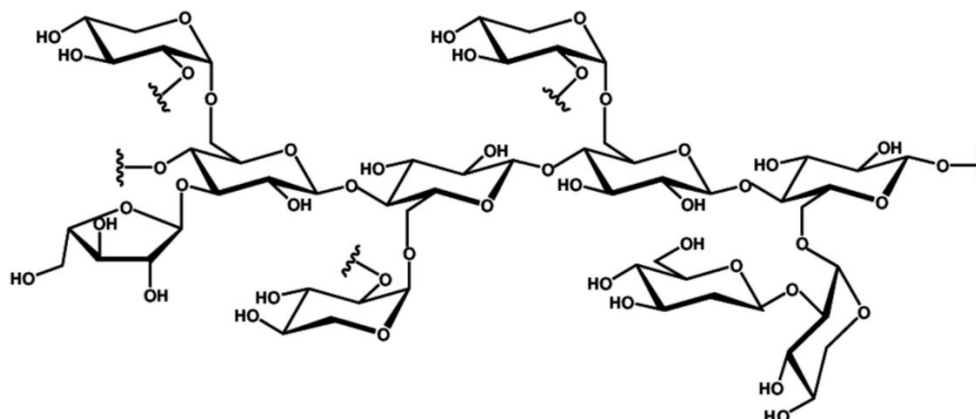
Fonte: Autor (2022).

3.1.2 Hemicelulose

A cadeia polimérica da hemicelulose é constituída pelas ligações entre açúcares monoméricos contendo 5 ou 6 átomos de carbono, tais como xilose, manose, galactose, glicose e arabinose. Grupos acetil são encontrados em grande número e são responsáveis por originar ácido fórmico e ácido acético. A partir da desidratação dos açúcares também são formados furfural e 5-hidroximetil furfural, que atuam como inibidores fermentativos e têm elevado valor agregado (BIZZI *et al.*, 2019; JIN *et al.*, 2020).

A hemicelulose se arranja na parede celular de forma ramificada e amorfa como é observado na Figura 2. Por esse motivo é mais suscetível à ataques ácidos, alcalinos ou enzimáticos em temperaturas mais baixas do que aquelas empregadas na degradação da celulose (HUBER, 2008).

Figura 2 - Estrutura molecular da hemicelulose.



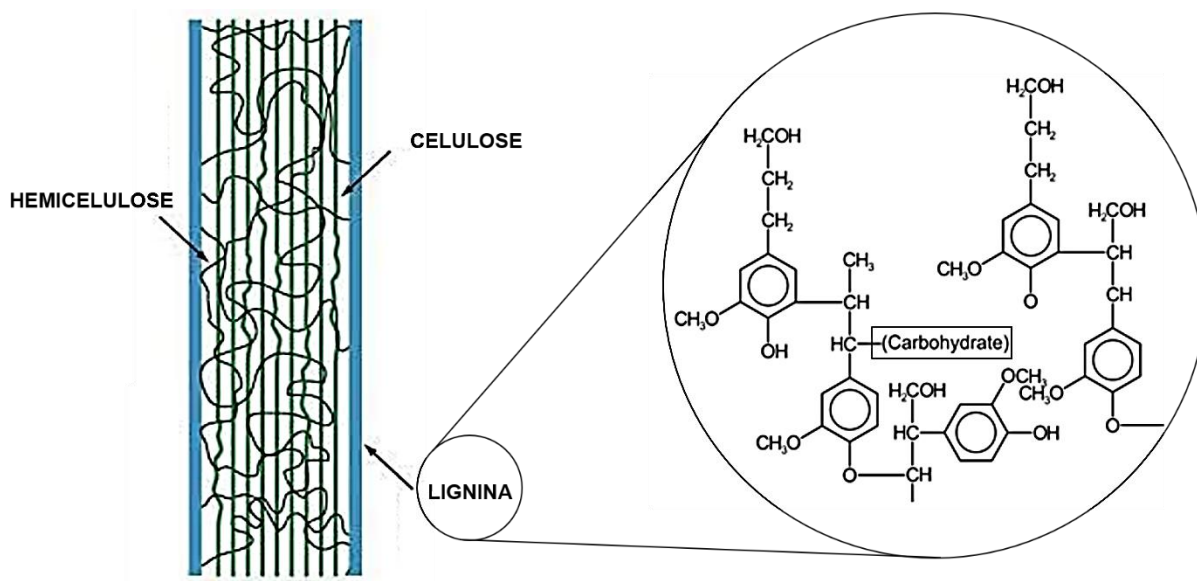
Fonte: adaptado de DONATE (2014).

Quando removida da estrutura lignocelulósica pode resultar em aumento do volume dos poros e, conseqüentemente, no aumento do contato de reagentes com a biomassa, visto que a hemicelulose está fisicamente associada à celulose (KAPARAJU *et al.*, 2010).

3.1.3 Lignina

A lignina é o maior componente não-carboidrato na biomassa lignocelulósica e tem as funções de conferir resistência e hidrofobicidade às paredes celulares das plantas e proteger os polissacarídeos da degradação microbiana (YOO *et al.*, 2020). Se une com a hemicelulose para se ligarem e preencherem lacunas entre as microfibrilas da celulose, fortalecendo a parede celular, como é mostrado na Figura 3 (SUN *et al.*, 2022). Devido a essas características, a lignina influencia diretamente na recalcitrância da biomassa, ou seja, atua como uma barreira resistente à ataques químicos, físicos ou biológicos, dificultando os processos de conversão da biomassa.

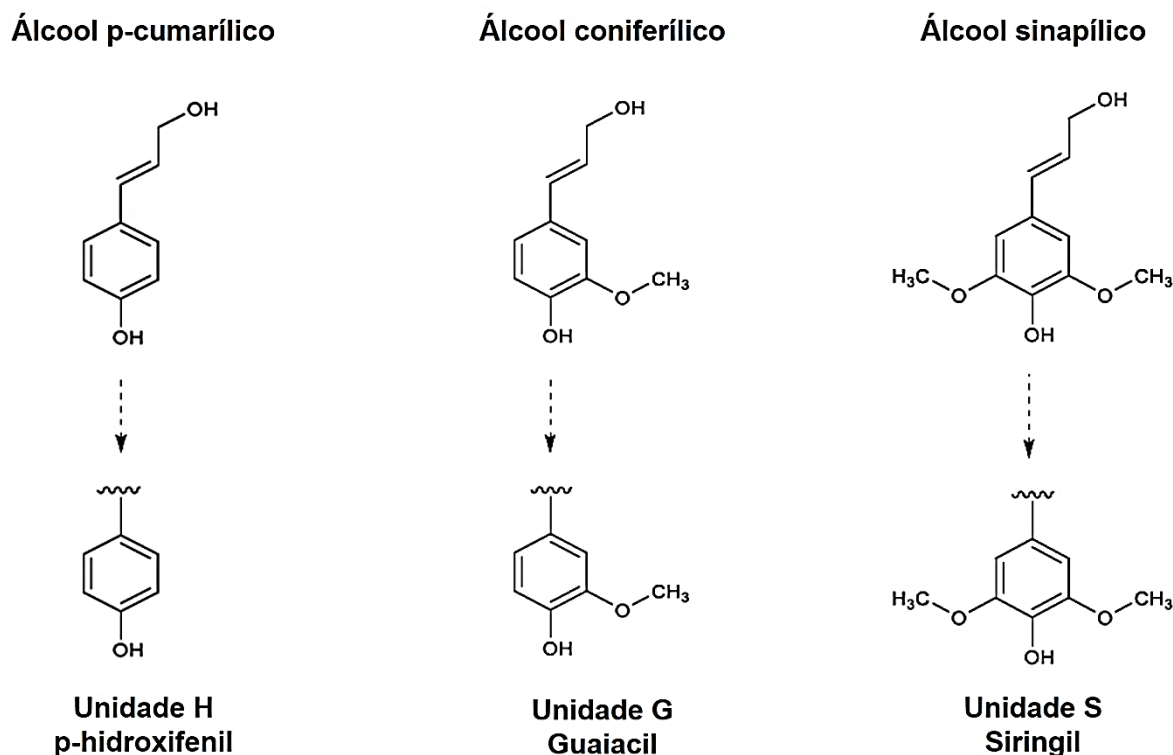
Figura 3 - Parede celular com destaque para a ligação entre carboidratos e a lignina.



Fonte: adaptado de MANO *et al.* (2013).

A lignina é definida como um biopolímero aromático complexo que tem como unidades básicas formadoras grupos álcoois fenilpropanóides com diferentes graus de metoxilação, como pode ser observado na Figura 4. Os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico originam os monolignóis hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente, que se polimerizam de forma amorfa ao longo da parede celular (OBYDENKOVA *et al.*, 2017). Os monolignóis estão presentes em todos os tipos de biomassa lignocelulósica, porém em proporções H:G:S diferentes para madeiras macias, madeiras duras, culturas herbáceas e resíduos agrícolas (HU *et al.*, 2012).

Figura 4 - Unidades formadoras da lignina.



Fonte: adaptado de JEDRZEJCZYK *et al.* (2021).

Uma das hipóteses que justificam a dificuldade de remoção desse componente está atrelada à possibilidade do grupo éter da lignina se ligar covalentemente aos grupamentos hidroxila dos carboidratos, formando complexos química e termicamente estáveis (YOO *et al.*, 2020).

3.1.4 Extrativos

São componentes presentes de forma não estrutural, ou seja, não são ligados à estrutura, mas estão presentes como materiais adsorvidos na superfície da biomassa, podendo ser removidos. Consistem em compostos solúveis em água, tais como açúcares, materiais inorgânicos do solo e compostos nitrogenados provenientes de fertilizantes. Também existe a fração de extrativos solúveis em etanol, como a clorofila e as ceras. Essa última tem fundamental relevância em processos de extração, uma vez que sua característica hidrofóbica dificulta o ataque ácido na parede vegetal da biomassa em processos de hidrólise (SLUITER *et al.*, 2005).

3.1.5 Materiais Inorgânicos

Os materiais inorgânicos, também chamados de cinzas, são caracterizados como o resíduo mineral que resta da combustão da biomassa. Eles podem ser estruturais (quando estão ligados à estrutura física da biomassa) ou extraíveis (podem ser removidos com lavagem ou extração) (SANTOS *et al.*, 2022).

3.2 VALORIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Após a fragmentação da estrutura lignocelulósica podem ser obtidos monômeros derivados da celulose, hemicelulose e lignina, como é o caso do furfural, hidroximetilfurfural, vanilina, álcoois (etanol, butanol, xilitol, arabinol), ácidos carboxílicos alifáticos (ácidos succínico, láctico, levulínico, vanílico, cumárico e ferúlico) (JOHNSTON *et al.*, 2020; ORIEZ *et al.*, 2019; XIAO B. *et al.*, 2001). Todos esses produtos de maior valor agregado derivados da biomassa são obtidos a partir de processos de conversão, que podem ser (ANSARI *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2022):

- a) **Químico:** adição de ácidos, álcalis ou solventes orgânicos na matriz lignocelulósica que viabilizam a desorganização, fragmentação e solubilização total ou parcial da biomassa. O uso de reagentes ácidos como o H_2SO_4 , desidrata a cadeia de carboidratos e causa a fragmentação dela em açúcares monoméricos. A degradação da celulose em glicose de resíduos lignocelulósicos, por exemplo, é a principal fonte de açúcar para geração de biocombustíveis líquidos como o etanol de segunda geração através de processos fermentativos.
- b) **Físico-químico:** moagem, irradiação com micro-ondas ou ultrassom visando a desorganização ou remoção de frações da biomassa. O pré-tratamento hidrotérmico e explosão de fibra de amônia utilizam soluções aquosas em elevada temperatura e pressão com a mesma finalidade;
- c) **Termoquímico:** processos como a gaseificação e pirólise degradam, respectivamente, parcial e totalmente o material vegetal. O bioóleo é obtido através da condensação de vapores provenientes da pirólise, a qual também origina o biocarvão. É amplamente utilizado como aditivo de combustíveis ou como o próprio combustível, após purificação, em substituição ao petróleo. A combustão do material vegetal também é classificada como rota termoquímica e tem duas finalidades industriais. Uma

delas é servir como combustível para queima e geração de vapor d'água em caldeiras. Também pode-se utilizar o próprio vapor gerado da combustão da biomassa para abastecer os equipamentos que dependem do calor para funcionar, tais como autoclaves e sistemas de calefação.

- d) Biológico:** baseado no emprego de enzimas que atuam diretamente na celulose (como por exemplo a celulase que participa do processo de sacarificação enzimática da biomassa) ou processos fermentativos para produção de biocombustíveis.

A partir da valorização da lignina, uma série de produtos de importância para indústrias de cosméticos, alimentos, fármacos, combustíveis, entre outros podem ser obtidos.

Devido às características antioxidantes dos compostos fenólicos presentes na lignina, os monômeros e seus derivados têm diversas aplicações. O ácido cumárico, por exemplo, é utilizado como aditivo em alimentos devido à sua capacidade antimicrobiana e anti-inflamatória. O ácido ferúlico é misturado aos demais componentes do protetor solar pois, além de neutralizar os radicais livres, também confere estabilidade ao produto (JOHNSTON *et al.*, 2020). O ácido cafeico está presente em cápsulas de uso oral para prevenção do envelhecimento. A vanilina é amplamente utilizada como aromatizante em alimentos (XIAO B. *et al.*, 2001).

Na indústria de polímeros a lignina pode ser empregada em compósitos com outros materiais, pois confere rigidez, força e leveza ao produto final (BHUSHAN *et al.*, 2020; NARRON *et al.*, 2016). O bioóleo pode ser empregado na geração de combustíveis e na aditivação dos mesmos, devido a sua estabilidade térmica e capacidade antioxidante (JEDRZEJCZYK *et al.*, 2021; OBYDENKOVA *et al.*, 2017).

Percebe-se que existe valor agregado nos produtos obtidos da lignina, o que a torna valiosa para diversos segmentos. Porém, devido à falta de investimento e estudo, a lignina é desvalorizada por muitas indústrias pois ainda é vista como um resíduo útil apenas para a queima e posterior geração de energia.

3.3 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO DE LIGNINA

Os exemplos de métodos de extração ou fragmentação da lignina mais comuns incluem a pirólise, hidrólise ácida e alcalina, processos organossolv, liquefação hidrotérmica, entre outros (DEVADASU *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2015). Geralmente, processos que empregam elevadas condições de temperatura e pressão no pré-tratamento também estão associados com o uso de reagentes ácidos e/ou alcalinos (diluídos ou concentrados), que atuam de formas diferentes na deslignificação da biomassa.

Em meio ácido ocorre a quebra das ligações glicosídicas e a hemicelulose é hidrolisada em açúcares fermentescíveis como a xilose, arabinose e, em menores quantidades, a manose e a galactose. Entretanto, a celulose continua na forma polimérica, mas acessível à tratamentos químicos e biológicos. A hidrólise da celulose e a solubilização da glicose ocorre somente se as condições de pré-tratamento forem severas, através do emprego de reagente ácidos associados a elevadas temperaturas. A solubilização ocorre, primeiramente, nas regiões amorfas da cadeia celulósica pois é mais acessível ao ácido e, após, sucede-se o ataque em regiões cristalinas da estrutura (HU *et al.*, 2012).

Entre os ácidos que podem ser utilizados, o mais empregado é o ácido sulfúrico. Além de apresentar um baixo custo quando comparado a outros ácidos minerais e orgânicos, é menos corrosivo e tóxico, além de apresentar boa eficiência (ORIEZ *et al.*, 2019). A característica desidratante do H_2SO_4 é vantajosa na solubilização dos carboidratos, uma vez que consome moléculas de água da estrutura, ocasionando a ruptura da cadeia polimérica em seus respectivos monômeros. Outros ácidos não causam tal efeito na estrutura lignocelulósica, sendo necessário utilizar outras técnicas para produção de açúcares, como a sacarificação enzimática, que torna o processo mais moroso e custoso. Quando o H_2SO_4 é empregado na hidrólise, também ocorre a fragmentação da lignina, porém em menor extensão do que a degradação observada com os carboidratos. É gerada a fração de lignina solúvel em ácido que contém, basicamente, compostos fenólicos. Sendo assim, o tratamento com H_2SO_4 também resulta na obtenção da lignina como um resíduo insolúvel da hidrólise. O uso de soluções diluídas de H_2SO_4 acarreta na formação de produtos de degradação dos carboidratos, tais como furfural e hidroximetilfurfural. Isto ocorre pois é necessário maior tempo de reação para compensar a baixa concentração ácida, condição que

provoca a decomposição da glicose em compostos inibidores da hidrólise enzimática. Já com o uso de concentrações ácidas elevadas pode ocorrer a repolimerização e condensação da lignina, porém a formação de compostos de degradação de carboidratos é minimizada (HU *et al.*, 2012; ORIEZ *et al.*, 2019).

Em contrapartida, o pré-tratamento alcalino visa a fragmentação da hemicelulose e lignina das biomassas lignocelulósicas. O processo hidrolítico envolvendo álcalis promove a solubilização de ligações de ésteres urônicos e acéticos da hemicelulose, além de clivagem das ligações α -éter entre lignina e hemicelulose. O resíduo sólido obtido desse pré-tratamento é a celulose com menor grau de cristalinidade, da qual se originam produtos úteis para a indústria de papel, biocombustível e alimentícia, por exemplo (XIAO B. *et al.*, 2001).

Tendo em vista os inconvenientes ocasionados pela lignina nos processos de conversão e valorização da biomassa, se torna imprescindível que a etapa de deslignificação da biomassa seja mais eficiente, rápida e econômica. Depois de removida, a lignina é frequentemente empregada na geração de energia através da queima pois é rica em material carbonáceo. Entretanto, é um resíduo que possui variadas aplicações industriais. Na Tabela 1 são listados alguns estudos que empregam métodos convencionais na remoção da lignina de biomassas lignocelulósicas.

Tabela 1 - Métodos de deslignificação de biomassas lignocelulósicas

Biomassa	Método de deslignificação	Ref.
Palha arroz	NaOH 0,2 mol L ⁻¹ à temperatura ambiente por 18 horas e tratamento com 3% H ₂ SO ₄ a 130 °C por 30 minutos.	(SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2020)
Bagaço cana de açúcar	Bagaço imerso em ácido fosfórico 0,5% v v ⁻¹ por 4 horas e posterior explosão à vapor a 180 °C por 10 minutos. Extração do resíduo com etanol anidro por 4 horas.	(ZENG <i>et al.</i> , 2014)
Palha de colza	Estágio com H ₂ SO ₄ diluído (130 °C, 60 min, 2% m v ⁻¹) seguido por H ₂ O ₂ 5% m v ⁻¹ em meio alcalino (NaOH) a 90 °C durante 90 minutos.	(ROMERO <i>et al.</i> , 2015)
Salgueiro	Reação da amostra com solução isopropanol-água (7:3 v v ⁻¹) sob agitação a 150 rpm por 6 h a 16 h entre 160°C e 210°C.	(WU <i>et al.</i> , 2018)
Palha de trigo	Extração com metanol e água (60:40 v v ⁻¹) e 0,1% de HCl a 85 °C por 4 h.	(XU <i>et al.</i> , 2006)
Espiga de milho	Extração com ácido fórmico a 88% e HCl a 0,2% (razão sólido/líquido de 10:1) a 60 °C por 8 horas.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)

Fonte: Autor (2022).

O fator crítico no uso de métodos convencionais para remoção de lignina é a demanda de elevadas quantidades de energia devido à necessidade de aquecimento dos sistemas e o longo tempo de reação, além de consumo de reagentes concentrados durante os experimentos. Por essa razão, técnicas alternativas são uma opção para economia de recursos e de conservação ou aumento de eficiência do processo. Dentre os métodos alternativos de extração geralmente empregados estão processos oxidativos; hidrólises com ácidos ou álcalis diluídos; líquidos iônicos e a energia ultrassônica, a qual pode ser usada isoladamente ou em conjunto com as demais (NARRON *et al.*, 2016). O ultrassom se destaca como uma das tecnologias alternativas mais promissoras para processos de deslignificação.

3.4 ULTRASSOM

3.4.1 Fundamentos

O ultrassom é gerado a partir da deformação mecânica de cristais piezoelétricos quando submetidos a um campo elétrico alternado (efeito piezoelétrico inverso). Esses cristais, chamados de transdutores, tem composição variada. Podem ser formados por topázio, quartzo ou materiais cerâmicos como o titanato de chumbo ou titanato zirconato de chumbo (PZT, do inglês *Lead Zirconate Titanate*), sendo este último o mais empregado em transdutores ultrassônicos (KRUG, 2019).

As ondas ultrassônicas atuam em frequências maiores do que 20 kHz e se propagam em ciclos consecutivos de rarefação (baixa pressão) e compressão (alta pressão), ocasionados pela deformação do cristal piezoelétrico. Quando o ultrassom é transmitido através de um líquido, no ciclo de rarefação da onda ultrassônica as forças coesivas do líquido podem ser superadas, formando cavidades. Essas cavidades são preenchidas com vapores do líquido e/ou gases dissolvidos no líquido (BUNDHOO *et al.*, 2018; FLORES *et al.*, 2021). De acordo com as propriedades do meio líquido, e em condições energéticas específicas, as bolhas podem implodir ao atingirem o tamanho crítico, o que resulta em microjatos e pontos chamados de “*hot spots*”, nos quais a temperatura e pressão podem chegar a 5500 °C e 500 atm, respectivamente (SUSLICK, 1989).

O colapso das bolhas de cavitação resulta em efeitos físico-químicos no meio reacional. Entre eles podem ser citados o aquecimento pontual, formação de microjatos, ondas de choque e microfluxos. Esses são responsáveis por intensificar o contato e penetração de reagentes em amostras sólidas ou líquidas, facilitar o transporte de fluidos no meio, além de proporcionar a dissolução de materiais sólidos. Há também a formação de radicais causada pelo colapso das bolhas de cavitação no solvente. Devido às elevadas condições energéticas atingidas na formação dos *hot spots*, a produção de radicais ($\bullet\text{H}$ e $\bullet\text{OH}$) é favorecida, que por sua vez promovem melhores taxas de reação (FLORES *et al.*, 2021).

Esses efeitos gerados pela cavitação acústica justificam o uso de sistemas ultrassônicos para a intensificação de processos que se destinam a extração, visto que podem levar à redução na cristalinidade, fragmentação e erosão da biomassa

lignocelulósica. Além disso, podem aumentar a solubilização de carboidratos e lignina com ácidos ou álcalis, reduzir o tamanho de partícula, viabilizar o emprego de reagentes diluídos, redução no tempo de extração e emprego de condições mais amenas de temperatura (BUNDHOO *et al.*, 2018; CHEMAT *et al.*, 2017).

3.4.2 Fatores que afetam a cavitação

Existem determinadas condições operacionais e reacionais que interferem na propagação das ondas ultrassônicas e na absorção ou atenuação da mesma (CAPELO-MARTÍNEZ, 2009; MASON *et al.*, 2002). Esses fatores são apresentados na sequência.

- a) Frequência:** Tem influência direta no comportamento e duração da bolha de cavitação. Sendo assim, a frequência define o tempo que as bolhas levam para completarem o ciclo de formação, crescimento e implosão, bem como o impacto gerado no meio reacional. Ondas ultrassônicas propagadas com frequências maiores possuem menor comprimento de onda e, conseqüentemente, o período da onda também é menor. Ondas de elevadas frequências podem ser suficientemente rápidas a ponto de disponibilizarem menos tempo do que o necessário para a formação e o crescimento da bolha de cavitação. Além disso, em condições que viabilizem a formação das bolhas, as mesmas são formadas em maior quantidade e menor tamanho, que ao colapsarem atenuam o efeito proveniente do colapso das bolhas adjacentes (*cushion effect*). Entretanto, a densidade acústica é maior, assim como o poder de penetração (efeito químico pronunciado). O inverso é observado em frequências menores, nas quais o ciclo acústico é mais longo. Dessa forma, as bolhas de cavitação têm mais tempo para serem formadas implicando em bolhas maiores e em menor quantidade de bolhas no meio. A consequência do emprego de frequências baixas está no maior impacto energético da implosão das bolhas (efeito físico pronunciado), porém percebe-se baixo poder de penetração e menor densidade de bolhas no meio.
- b) Intensidade:** De forma geral, a intensidade deve ser ajustada com o objetivo de gerar as vibrações necessárias para a formação das bolhas de cavitação. A intensidade é proporcional ao quadrado da amplitude do ultrassom. Logo, quanto maior for a amplitude de vibração, mais energia

ultrassônica é dissipada no meio, favorecendo os efeitos sonoquímicos. O aumento da amplitude da onda é útil quando soluções de alta viscosidades são utilizadas devido à dificuldade de formação de bolhas de cavitação no meio. O incremento de intensidade também é benéfico na compensação do uso de frequências maiores, onde o tempo para a formação das bolhas de cavitação é bastante reduzido. Porém, o emprego da máxima amplitude de vibração pode causar a deterioração dos transdutores em alguns equipamentos.

- c) **Viscosidade:** A viscosidade tem relação com a coesão das moléculas em um líquido. Logo, quanto menor for a viscosidade, menor também é a coesão entre as moléculas do líquido, e a formação das bolhas de cavitação é favorecida.
- d) **Tensão superficial:** As bolhas de cavitação são formadas no ciclo de rarefação quando as forças coesivas do líquido são superadas pela rarefação da onda de ultrassom. É esperado, portanto, que menores tensões superficiais do líquido facilitem a geração das bolhas.
- e) **Temperatura:** As temperaturas baixas dificultam a cavitação, ou seja, quanto menor a temperatura, maior será o limiar de cavitação (definido como a energia necessária para formar a cavidade no líquido). Isso ocorre devido ao aumento da tensão superficial e da viscosidade do líquido, que dificultam a propagação da onda. Além disso, em baixas temperaturas se observa a redução da pressão de vapor do solvente, diminuindo o número de bolhas de cavitação formadas.
- f) **Pressão de vapor:** Um aumento na pressão de vapor do solvente auxilia na geração das bolhas de cavitação visto que são formadas pela migração de vapores dissolvidos no líquido para o interior da cavidade. Portanto, solventes voláteis formam bolhas mais facilmente, mas que em grandes quantidades podem amortecer o impacto do colapso e diminuir a energia propagada no meio reacional. De forma contrária, solventes com menor pressão de vapor aumentam o limiar de cavitação.
- g) **Pressão externa:** O aumento da pressão externa torna necessário que mais energia seja empregada na mudança das moléculas que estão no estado líquido para o gasoso. Sendo assim, mais intenso deverá ser o ciclo de rarefação para superar a pressão do meio e formar as bolhas de

cavitação. Em condição de aumento de pressão o colapso das bolhas será mais energético e mais efeitos sonoquímicos poderão ser intensificados.

- h) Gás dissolvido:** Bolhas de gás dissolvido no líquido atuam como núcleos de cavitação, pois são locais onde a força de coesão das moléculas do líquido é menor. Sendo assim, a presença de gases dissolvidos reduz o limiar de cavitação.
- i) Material particulado:** Materiais particulados reduzem a energia necessária para formar as bolhas pois também atuam como núcleos de cavitação. Sólidos com cavidades tendem a formar bolhas na interface com o líquido, que submetidas à baixa pressão do ciclo de rarefação podem se afastar das partículas sólidas e produzir bolhas dispersas no meio.

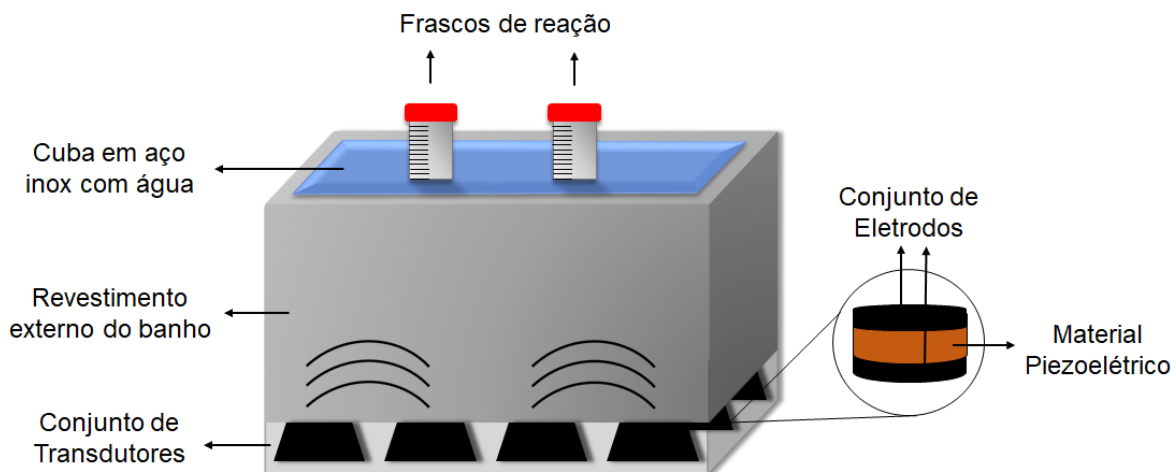
Todos esses aspectos precisam ser observados durante o emprego do ultrassom para intensificação de processos, uma vez que prejudicam ou favorecem os efeitos sonoquímicos.

3.4.3 Reatores sonoquímicos

Os reatores sonoquímicos são subdivididos de acordo com a aplicação de energia no meio reacional. Eles podem ser de aplicação direta (como as sondas de ultrassom), semidireta (do tipo cup-horn) ou indireta (banhos ultrassônicos) (CAPELO-MARTÍNEZ, 2009). Nesse trabalho será destacado somente a abordagem indireta do ultrassom.

Em banhos ultrassônicos, os cristais piezoelétricos estão localizados na base da cuba de aço inoxidável como mostrado na Figura 5. Por esse motivo a aplicação do ultrassom é caracterizada como sendo de forma indireta. As ondas ultrassônicas irradiadas pelos cristais ultrapassam a barreira física da cuba para então serem transmitidas ao meio líquido (geralmente água) e, somente após, se propagarem através do frasco reacional/reator, momento em que haverá o contato entre o ultrassom e a amostra. Logo, a intensidade das ondas ultrassônicas que atingem a amostra será menor que a inicialmente empregada (CAPELO-MARTÍNEZ, 2009). Há casos onde a amostra está disposta na própria cuba do banho, modo que reduz a atenuação de energia causada pelo frasco de reação, caracterizando uma forma de aplicação direta da energia ultrassônica.

Figura 5 - Representação dos componentes de um banho ultrassônico



Fonte: Autor (2022).

Os banhos ultrassônicos são caracterizados por terem baixa intensidade acústica ($1 - 5 \text{ W cm}^{-2}$) quando comparados às sondas ($50 - 200 \text{ W cm}^{-2}$). Porém, podem viabilizar maior frequência analítica dependendo do volume interno da cuba e da distribuição dos transdutores (KRUG, 2019).

3.4.4 Deslignificação assistida por ultrassom

O ultrassom tem sido uma das principais técnicas empregadas em pré-tratamentos que visam a remoção parcial ou total da lignina de biomassas lignocelulósicas. Devido aos efeitos sonoquímicos (formação de radicais) e mecanoacústicos (aquecimento, microjatos, microfluxos, ondas de choque e transferência de massa) gerados pela cavitação, diversos trabalhos relatam desorganização das cadeias, diminuição no tamanho de partícula e solubilização de lignina como consequências do uso do ultrassom.

Como pode ser observado na Tabela 2, existem variadas formas de aliar o ultrassom a outros tratamentos já estabelecidos para a remoção da lignina. A principal vantagem está na intensificação da deslignificação, visto que os autores relataram aumento nas remoções de lignina. MOHAPATRA *et al.* (2017), por exemplo, obtiveram acréscimo de 47% na deslignificação de capim *Pennisetum sp.* quando a energia ultrassônica foi empregada.

Tabela 2 - Métodos de deslignificação assistida por ultrassom de biomassas lignocelulósicas.

Método de deslignificação da biomassa	Referência
Pré-tratamento de <u>capim Pennisetum sp.</u> com HCl a 1% assistido por ultrassom com uma fonte de alimentação de 100 W, temperatura de 80 °C e ciclo de trabalho de 70%. Posterior autoclavagem a 121 °C por 130 min resultou em deslignificação de 80,4%.	(MOHAPATRA <i>et al.</i> , 2017)
A <u>palha de cevada</u> e H ₂ SO ₄ 3,7% (razão líquido/sólido de 20:1) foram sonicados em banho ultrassônico a 80°C por 40 min com posterior agitação de 500 rpm a 90°C por 23 min. O conteúdo do frasco foi filtrado e o sólido foi lavado com água destilada e seco. O sólido foi sonificado com NaOH 8% (20:1) por 40 min a 80 °C com posterior agitação de 750 rpm a 90°C por 90 min. O conteúdo foi filtrado e o líquido foi misturado com Acetato de Etila (3:1 v v ⁻¹) e agitada com 2000 rpm à temperatura ambiente por 6 h. Após a separação das fases em funil de separação, a fase precipitada foi seca em estufa a 50°C por 12h para obtenção da lignina final.	(MOHAMM ADABADI <i>et al.</i> , 2020)
Cerca de 1 g <u>palha de milho</u> foi tratada com 20 g do líquido iônico [HMIM]Cl (cloreto de 1-H-3-imidazol) e 4 mL de água deionizada a 70 °C por 3h de sonicação a 400 W. Após, foi filtrada, lavada com água e seca por 24h para obtenção de lignina isolada com rendimento de 60,48%.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Autor (2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

As amostras foram cominuídas com um moinho de facas (modelo TE 048, Marconi, Piracicaba, Brasil). O diâmetro de partícula foi determinado utilizando um agitador de peneiras magnético (modelo N 378, Bertel Indústria Metalúrgica LTDA, Caieiras, Brasil). Para a determinação do teor de umidade foi utilizado uma estufa (modelo 400/2ND, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil). A determinação de cinzas da amostra foi feita com a utilização de um forno tipo mufla (modelo 0913, Jung, Blumenau, Brasil). Para a remoção de extrativos da amostra foi utilizado um sistema soxhlet com mantas de aquecimento (modelo SL 123/500, Solab Científica, Piracicaba, Brasil).

Para a análise de proteínas foi utilizado um bloco digestor contendo balões de Kjeldahl para adição da amostra e reagentes, um destilador e um sistema de titulação.

Para o processo alternativo de hidrólise ácida foram avaliados sistemas de banho de ultrassom operando em diferentes frequências: 25 ou 45 kHz com potência nominal de 100 W (Transsonic TI-H-5 3,5); 37 ou 80 kHz com potência nominal de 330 W (Transsonic P120H 9,0 L); 35 ou 130 kHz com potência nominal de 200 W (Transsonic TI-H-10 8,6 L), todos da marca Elma GmbH & Co., Singen, Alemanha.

A segunda etapa de hidrólise ácida foi realizada em autoclave (modelo CS, Primatec, Porto Alegre, Brasil). A produção de glicose, xilose e arabinose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RID, do inglês *High Performance Liquid Chromatography Refractive Index Detector*, equipamento da marca Shimadzu, Tóquio, Japão), equipado com degaseificador DGU-20A5, bomba quaternária LC-20AT, controlador do sistema CBM-20A, amostrador automático SIL-20A, forno para coluna CTO-20A, detector de índice de refração RID-10A e software LCsolution. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm – 9 µm de diâmetro de partícula), Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA. A determinação do teor de lignina solúvel da amostra foi feita em espectrofotômetro que abrange o espectro do ultravioleta ao visível (modelo UV-1800, Shimadzu, Tóquio, Japão).

Para investigar constituição dos resíduos sólidos após hidrólise, bem como para auxiliar na caracterização estrutural da palha de milho, foi utilizada a espectroscopia no infravermelho (IR) utilizando espectrômetro PerkinElmer (modelo Spectrum One® FTIR, Waltham, EUA) equipado com acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco (PerkinElmer). Argônio foi utilizado como gás de purga do acessório (99,998% de pureza, White Martins, Brasil).

Para análise morfológica das matérias-primas e resíduos da hidrólise ácida foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (modelo Sigma 300 VP, Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra).

4.2 REAGENTES

A água destilada utilizada para preparar todas as soluções padrão e reagentes foi purificada usando um sistema modelo Milli-Q (Ultrapure Water Purification systems, Gradient system, Millipore, EUA). A água obtida no processo de purificação apresentou resistividade de 18,2 MΩ cm. Todos os reagentes utilizados neste trabalho eram de grau analítico. Água ultrapura e etanol 95% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados na remoção de extrativos da biomassa. Para as hidrólises ácidas foi empregado ácido sulfúrico 95-98% (Química Moderna, Barueri, Brasil). No desenvolvimento do método cromatográfico para a determinação da composição dos hidrolisados por HPLC-RID, foram utilizados D-glicose anidra (96%), xilose (99%) e arabinose (98%) da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). A acetonitrila e metanol usados na análise de HPLC foram adquiridos da Sigma (Roedermark, Alemanha) e da Tedia Company (Fairfield, CT, EUA), respectivamente. Foram utilizados nitrogênio e argônio (pureza de 99,998% para ambos, White Martins) para a purga dos equipamentos de SEM (do inglês *Scanning Electron Microscopy*) e FT-IR.

Os resíduos químicos gerados durante o trabalho foram armazenados e encaminhados para o programa de gerenciamento de resíduos químicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), responsável pela destinação final.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Teor de umidade

Para a obtenção do valor de umidade total da palha de milho foi seguido o procedimento proposto pelo Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL)

denominado “Determinação de Sólidos Totais em Biomassa e Sólidos Totais Dissolvidos em Amostras Líquidas”. Para isso, cerca de 1 g de amostra foi colocado em placa de petri previamente seca e pesada, em triplicata. As placas com amostra foram submetidas ao aquecimento em estufa com circulação de ar na temperatura de 105°C por 4 horas. As amostras foram removidas da estufa, resfriadas até temperatura ambiente, pesadas e então recolocadas na estufa. Esse processo foi repetido até massa constante. O teor de umidade foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Umidade (\%)} = 100 - \left(\frac{(Mca - Mc)}{Mbu} \times 100 \right) \quad (1)$$

Onde,

Mca = massa do cadinho com amostras após secagem, g;

Mc = massa do cadinho seco, g;

Mbu = massa da amostra em base úmida, g.

Alguns componentes quantificáveis da biomassa podem ser degradados durante o processo de aquecimento e por esse motivo a biomassa não pode ser seca em temperaturas superiores a 40 °C. Dessa forma, a massa de amostra utilizada nos experimentos deve ser relatada em massa seca, calculada de acordo com a Equação 2:

$$\text{Massa seca (g)} = \frac{Mbu \times ST (\%)}{100} \quad (2)$$

Onde,

Mbu = massa da amostra em base úmida, g;

ST = porcentagem de sólidos totais da amostra, ou seja, 100% (-) teor de umidade.

4.3.2 Teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas da amostra o procedimento também foi baseado naquele utilizado pelo NREL chamado “Determinação de Cinzas em Biomassa”. Os cadinhos foram calcinados em forno mufla a 575 ± 25 °C por 4 horas,

resfriados até temperatura ambiente e pesados. Cerca de 1,5 g de palha de milho foram pesados nos cadinhos, em triplicata e dispostos na mufla seguindo o programa de aquecimento: aquecimento até 105 °C e permanência por 12 minutos; rampa até 250 °C a 10 °C por minuto e permanência por 30 minutos; rampa até 575 °C a 20 °C por minuto e permanência por 180 minutos. Após resfriarem até 105 °C aproximadamente, os cadinhos foram removidos da mufla, pesados e retornaram para aquecimento a 575 °C até massa constante. O teor de cinzas da palha de milho foi calculado a partir da Equação 3:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{M_{cc} - M_c}{M_{bs}} \times 100 \quad (3)$$

Onde,

M_{cc} = massa do cadinho calcinado com cinzas, g;

M_c = massa do cadinho seco, g;

M_{bs} = massa da amostra em base seca, g.

4.3.3 Teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas pelo método Kjeldahl foi feita em 3 etapas (WANG *et al.*, 2016). A primeira compreende a decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a 400 °C com ácido sulfúrico concentrado. O catalisador sulfato de cobre acelera a oxidação da matéria orgânica e como produto obtém-se o sulfato de amônio. Após, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presente na solução ácida resultante é determinado por destilação por arraste de vapor. O sulfato de amônio é tratado com hidróxido de sódio em excesso, ocorrendo a liberação de amônia. Em seguida, o produto da reação (amônia) é coletado em frasco contendo uma quantidade conhecida de HCl. O excesso de HCl que não reagiu é titulado com NaOH padronizado para determinar o quanto de ácido foi consumido pela amônia. Na determinação da proteína bruta, multiplica-se o valor do nitrogênio orgânico total encontrado pelo método de Kjeldahl por um fator que converte o nitrogênio em proteína. O NREL adota o fator de 4,6 para a palha de milho. O teor de nitrogênio total foi calculado com a Equação 4:

$$\text{Teor de N (\%)} = \frac{(V_a - V_b) \times F \times 0,0014}{m} \times 100 \quad (4)$$

Onde,

V_a = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, mL;

V_b = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco, mL;

F = fator de correção de molaridade do ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹;

0,0014 = gramas de nitrogênio equivalente à 1 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹;

m = massa da amostra em base seca, g.

4.3.4 Remoção de extrativos

A remoção de extrativos é necessária para evitar interferências em etapas posteriores de determinação, portanto, deve ser feita na amostra *in natura* que será destinada aos experimentos. Esse procedimento foi baseado naquele proposto pelo NREL com otimizações específicas para palha de milho. Cerca de 3 a 5 g de palha de milho foram pesados em cartuchos confeccionados em papel filtro, em triplicata.

A extração foi feita em duas etapas em sistema Soxhlet. A primeira etapa compreende a remoção de componentes extraíveis em água, por um período de 8 horas, com 4 a 5 ciclos de refluxo por hora. A segunda etapa tem a finalidade de remover os constituintes solúveis em etanol 95% por um período de 24 horas, com 5 a 6 ciclos de refluxo por hora.

Após finalizar as duas etapas de extração, as amostras foram totalmente transferidas do cartucho para placa de petri com papel filtro previamente secos a 105 °C. O teor de extrativos foi calculado a partir da Equação 5 abaixo:

$$\text{Teor de Extrativos (\%)} = \frac{M_{bs} - M_e}{M_{bs}} \times 100 \quad (5)$$

Onde,

M_{bs} = massa da amostra em base seca, g;

M_e = massa da amostra livre de extrativos em base seca, g.

A palha de milho livre de extrativos foi seca ao ar para evitar degradação de compostos quantificáveis, como os açúcares.

4.3.5 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida tem a finalidade de solubilizar os carboidratos em sua forma monomérica e fracionar a lignina em fração solúvel e fração insolúvel.

A primeira etapa do procedimento de hidrólise ácida consistiu em adicionar 3 mL de ácido sulfúrico a 72% a 300 mg de palha de milho por um período de 1 h em uma banho-maria a 30 °C. Após, os tubos contendo a amostra foram retirados do banho-maria e diluiu-se a solução a 4% de H₂SO₄ adicionando 84 mL de água ultrapura ao frasco. A solução diluída contendo a amostra foi colocada em autoclave a 121 °C por 1 h. A solução resultante das duas etapas de hidrólise foi filtrada em cadinho de porcelana de fundo poroso com o auxílio de uma bomba de vácuo.

A fração líquida foi utilizada para quantificar a lignina solúvel e carboidratos, enquanto o resíduo sólido foi empregado na quantificação da lignina insolúvel, bem como exigido pelo método padrão do NREL (Relatório Técnico NREL/TP-510-42618, contrato nº DE-AC36-08GO28308). Esses procedimentos são detalhados na sequência.

4.3.6 Teor de lignina solúvel

A solução resultante da filtração é analisada em espectrofotômetro na região do ultravioleta para quantificar o teor de lignina solúvel no hidrolisado da palha de milho.

Primeiramente é feita a leitura da solução do branco (4% de H₂SO₄) no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 320 nm e cubeta de quartzo. A absorbância do branco é descontada das leituras das amostras. Em seguida a amostra é diluída com a solução do branco a fim do valor da absorbância se manter na faixa linear de 0,7 a 1,0 unidades. O valor da absorbância e os demais parâmetros foram substituídos na Equação 6 para resultar no teor de lignina solúvel. O restante da solução foi utilizada na quantificação de carboidratos.

$$\text{Lignina solúvel (\%)} = \frac{(\text{Abs} \times \text{FD}) \times \text{Vfil}}{\text{M} \times \text{b} \times \epsilon} \times 100 \quad (6)$$

Onde,

(Abs x FD) = absorvância multiplicada pelo fator de diluição;

V_{fil} = volume do filtrado (87 mL);

M = massa da amostra em base seca, mg;

b = caminho óptico da cubeta;

ε = absorvidade molar (30 L/g cm).

4.3.7 Teor de lignina insolúvel e total

Em cadinhos de fundo poroso, previamente secos e pesados, foi feita a filtração do resíduo sólido da biomassa proveniente da hidrólise ácida. O resíduo foi lavado com água ultrapura para retirar o ácido remanescente. Os cadinhos contendo o resíduo insolúvel em ácido foram secos em estufa a 105 °C por 4 horas e, após alcançarem a temperatura ambiente, foram pesados. As massas foram substituídas na Equação 7 para determinar o teor de resíduo insolúvel em ácido (RAI), que representa parte da quantificação do teor de lignina insolúvel.

$$\text{RAI (\%)} = \frac{M_{\text{rai}} - M_{\text{c}}}{M_{\text{bs}}} \times 100 \quad (7)$$

Onde,

M_{rai} = massa do cadinho com resíduo ácido insolúvel, g;

M_c = massa do cadinho vazio, g;

M_{bs} = massa da amostra em base seca, g.

Posteriormente, os cadinhos foram calcinados em mufla como segue: aquecimento até 105 °C e permanência por 12 minutos; rampa de 10 °C por minuto até 250 °C e permanência por 30 minutos; rampa de 20 °C por minuto até 575 °C e permanência por 180 minutos. Após resfriarem até temperatura ambiente, os cadinhos foram pesados, sendo calculado o teor de lignina insolúvel na palha de milho de acordo com a Equação 8.

$$\text{Lignina Insolúvel (\%)} = \frac{(M_{\text{rai}} - M_{\text{c}}) - (M_{\text{cc}} - M_{\text{c}})}{M_{\text{bs}}} \times 100 \quad (8)$$

Onde,

Mrai = massa do cadinho calcinado com resíduo ácido insolúvel, g;

Mc = massa do cadinho vazio, g;

Mcc = massa do cadinho calcinado com cinzas, g;

Mbs = massa da amostra em base seca, g.

O teor de lignina total é definido como a soma da lignina solúvel e insolúvel, em porcentagem.

4.3.8 Quantificação de carboidratos

Com o propósito de avaliar a eficiência das hidrólises ácidas e quantificar a produção de carboidratos fermentescíveis nos hidrolisados, a concentração de glicose, xilose e arabinose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RID). As amostras foram permeadas em filtro com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *Polyvinylidene Fluoride*, 13 mm x 0,45 µm) e diluídas em água ultrapura (1:5 v v⁻¹). A Tabela 3 descreve as condições cromatográficas.

Tabela 3 - Condições cromatográficas empregadas nas determinações de açúcares por HPLC-RID.

Parâmetro	Condições cromatográficas
Coluna	Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm – 9 µm partícula)
Temperatura	50 °C
Fase móvel	Água ultrapura contendo 5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄
Vazão	0,5 mL min ⁻¹
Modo de Eluição	Isocrático
Volume de injeção	20 µL
Tempo de retenção	10,7 min (Glicose), 11,5 min (Xilose) e 12,6 min (Arabinose)

Fonte: Autor (2022).

4.3.9 Mapeamento dos banhos de ultrassom

Previamente à extração de lignina assistida por ultrassom foi realizado um mapeamento com a finalidade de selecionar os locais dos sistemas que possuem a

maior intensidade acústica. Dessa forma, os frascos reacionais podem ser alocados sempre na mesma posição, evitando alterações de resultados devido a mudanças na propagação ou distribuição do campo acústico de ultrassom. Para isso, uma folha de papel alumínio foi cortada nas dimensões da cuba do banho, colocado sobre a película de água no fundo da cuba e submetido à sonicação. Os locais onde ocorreram as perfurações mais intensas na folha de alumínio foram selecionados para alocar os frascos de reação durante os experimentos (MERONI *et al.*, 2022).

4.3.10 Deslignificação assistida por ultrassom

A proposta deste trabalho foi avaliar o emprego do ultrassom na deslignificação da palha de milho. Nesse sentido, foram estudados sistemas de ultrassom do tipo banho, devido ao uso ser frequentemente relatado na literatura para extrações sólido/líquido (CHEMAT *et al.*, 2017; FLORES *et al.*, 2021; LUO *et al.*, 2014), possuir maior frequência analítica quando comparado a sondas e cup horn e também pela necessidade de empregar ácido concentrado na hidrólise, dificultando o uso dos demais sistemas, onde as partes metálicas do US estariam em contato com o ácido.

A hidrólise ácida assistida por ultrassom consistiu em utilizar as condições já definidas no procedimento padrão (seção 4.3.5) nestes experimentos. Portanto, ao frasco reacional foram adicionados 3 mL de H₂SO₄ a 72% a 300 mg de palha de milho. Os frascos foram colocados na cuba dos banhos ultrassônicos nas regiões previamente determinadas pelo mapeamento. A primeira etapa da hidrólise ocorreu em uma temperatura de 30 °C por 60 minutos. Posteriormente, a solução resultante da hidrólise foi diluída e autoclavada seguindo o procedimento do NREL, e por último filtrada, para realizar as determinações de lignina solúvel (seção 4.3.6), carboidratos (seção 4.3.8), e lignina insolúvel (seção 4.3.7).

Os experimentos seguiram um planejamento univariado, ou seja, uma das condições foi variada enquanto as demais se mantiveram fixas. Dessa forma, o planejamento iniciou com a avaliação das frequências ultrassônicas (25, 35, 37, 45, 80 e 130 kHz). Para cada teste de frequência foi mantida a amplitude intermediária do ultrassom (50%). Em seguida foram avaliados o tempo da primeira etapa da hidrólise (5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos), o tempo de autoclavagem (30, 45 e 60 minutos) e a amplitude do ultrassom (50, 75 e 100%). A temperatura da hidrólise assistida por ultrassom não foi avaliada neste estudo pois já está em uma faixa energeticamente

favorável para aplicações laboratoriais e industriais (30 °C). Além disso, outros trabalhos citados na literatura também utilizaram a mesma temperatura em seus estudos, ou variações de 25 até 35 °C (LAUBERTE *et al.*, 2021; SIPPONEN *et al.*, 2013).

4.3.11 Calorimetria

A calorimetria é uma das formas de mensurar a energia dissipada no meio pelo ultrassom, visto que a potência nominal é diferente da potência do equipamento efetivamente dissipada no meio de reação. Ao monitorar a temperatura do líquido, obtém-se informações sobre a quantidade de energia que entra no reator sonoquímico.

A medida da calorimetria foi feita nas mesmas condições que os experimentos reais. Logo, os frascos foram colocados na cuba do banho nas mesmas posições pré-determinadas e neles continham 3 mL de H₂SO₄ a 72%. A temperatura foi medida em um intervalo definido de tempo (1 minuto), dentro do frasco reacional. A massa considerada no cálculo de potência dissipada foi da solução de ácido sulfúrico. O cálculo referente a potência liberada no meio reacional e da densidade acústica estão mostrados nas equações 1 e 2, respectivamente.

$$P = \frac{(\Delta T C_p M)}{\Delta t} \quad (9)$$

$$D = \frac{P}{v} \quad (10)$$

Onde,

P = potência dissipada, em W;

ΔT = variação de temperatura, em °C;

C_p = calor específico da solução (J g⁻¹ °C⁻¹);

M = massa da solução submetida à energia ultrassônica, em g;

Δt = variação de tempo, em s;

D = densidade de potência, em W dm⁻³;

v = volume da solução ácida, em dm³.

4.3.12 Caracterização por FT-IR

Para caracterização estrutural da lignina extraída após os processos de hidrólise, foram obtidos espectros por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das matérias-primas e resíduos após hidrólise ácida convencional e com aplicação de ultrassom. Previamente à aquisição de cada espectro, foi coletado um espectro de referência (background), sem a amostra, na superfície do cristal. Logo após a aquisição do espectro de referência, as amostras foram dispostas no compartimento do acessório sobre o cristal e submetidas à análise. O equipamento foi purgado continuamente com argônio para eliminar qualquer contribuição da umidade do ar e do CO₂ na obtenção dos espectros. Posteriormente, o compartimento do acessório foi cuidadosamente limpo com acetona e seco com papel absorvente. As seguintes condições operacionais foram utilizadas na obtenção dos espectros: região espectral de 650 a 4000 cm⁻¹, 16 scans, resolução de 4 cm⁻¹ e força aplicada sobre a amostra de 85 N m².

4.3.13 Caracterização por SEM

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) foi aplicada para investigação morfológica e topográfica das matérias-primas e resíduos da hidrólise ácida. O microscópio eletrônico de varredura é composto por filamento de emissão por campo (FEG, do inglês *Field Emission Gun*) do tipo *Schotky* (filamento de tungstênio recoberto com óxido de zircônio), equipado com coluna Gemini no modo de pressão variável (VP, do inglês *Variable pressure*). As imagens foram obtidas com o uso do detector de elétrons secundários em pressão variável (VPSE, do inglês *Secondary Electrons at Variable Pressure*).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE COMPOSICIONAL DA PALHA DE MILHO

A palha de milho seca ao ar e moída na granulometria exigida (≥ 20 mesh) foi caracterizada seguindo as metodologias padrões do NREL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização da palha de milho *in natura* e livre de extrativos determinados com base na norma do NREL (média \pm desvio padrão, n = 3).

Determinação	Teor, %
Palha <i>in natura</i>	
Umidade	6,78 \pm 0,20
Proteínas	6,70 \pm 0,29
Extrativos	3,38 \pm 0,21
Cinzas	2,07 \pm 0,08
Palha livre de extrativos	
Carboidratos	86,68 \pm 0,46
Lignina total	9,67 \pm 0,08
Proteínas	4,88 \pm 0,02
Cinzas	1,17 \pm 0,01
Total	102,40 \pm 0,57

Fonte: Autor (2022).

A partir da Tabela 4 é possível observar que o teor de umidade da palha *in natura* se encontra na faixa adequada para a realização da hidrólise ácida. O NREL menciona que teores de umidade maiores que 10% causam a diluição considerável do ácido sulfúrico, acarretando em menor degradação de carboidratos e conseqüentemente um teor de lignina superestimado na amostra (SLUITER, A. *et al.*, 2008). Como a amostra não pode ser seca em temperaturas maiores que 40 °C, o teor de umidade deve ser descontado nos cálculos para considerar a pesagem da palha de milho em massa seca. Devido a este ajuste, a umidade não foi somada ao balanço de massa final.

A remoção de extrativos da palha de milho é outra etapa extremamente importante para as determinações subsequentes e visa a retirada de açúcares e

compostos nitrogenados solúveis em água, bem como ceras e clorofila solúveis em etanol (SLUITER *et al.*, 2005). Todos esses componentes, isolados ou em conjunto, causam interferências nas etapas posteriores de quantificação de lignina e carboidratos. No caso da biomassa utilizada neste trabalho, se os extrativos não forem removidos, aproximadamente 3,38% da massa será contabilizada como lignina, gerando um resultado superestimado. Além disso, a permanência dos extrativos na palha pode resultar em uma hidrólise incompleta visto que as ceras formam uma camada hidrofóbica na superfície da palha, impedindo a penetração do ácido sulfúrico. Outro problema está relacionado com a presença de açúcares solúveis em água na palha de milho *in natura*, pois podem resultar em teor superestimado de carboidratos e lignina se não forem retirados da amostra. Como a palha de milho livre de extrativos foi utilizada nas demais determinações, foi a partir desta amostra que os teores de carboidratos, cinzas, proteínas e lignina total foram quantificados.

Os materiais inorgânicos representam 2,07% da composição da palha *in natura*. Foi possível observar que cerca de 0,9% dos materiais inorgânicos foi retirado durante a etapa de remoção dos extrativos. A baixa concentração de constituintes inorgânicos na palha sem extrativos favorece o uso dessa biomassa industrialmente, visto que problemas por incrustação, perda de poder calorífico e geração de resíduos ao final do processo serão minimizados. Não foi feita a determinação de metais dessa fração, porém, de acordo com a literatura, podem se tratar majoritariamente de metais parcialmente solúveis em água como Ca, Sr, Mn e Mg (SANTOS *et al.*, 2022).

O teor de proteínas foi estimado em relação ao teor de nitrogênio na amostra multiplicado pelo fator de conversão, que para a palha de milho é 4,6 segundo o NREL (HAMES *et al.*, 2008). Para a amostra *in natura* foi obtido teor de nitrogênio de 1,46%, enquanto para a palha de milho livre de extrativos foi de 1,06%. Percebe-se que parte do conteúdo foi extraído no processo de remoção de extrativos, que tem como finalidade retirar os compostos nitrogenados provenientes do solo e da nutrição da planta. O teor de nitrogênio tem fundamental importância na avaliação nutricional da planta, bem como na viabilização de processos que visam a queima da biomassa, pois implica diretamente na quantidade de gases NO_x liberados na atmosfera (ZHANG *et al.*, 2022). Entretanto, o NREL afirma que o teor de proteína no resíduo de lignina insolúvel em ácido é baixo. Logo, se a lignina obtida for utilizada para geração

de energia através da queima, não irá contribuir de forma expressiva para a geração de gases do efeito estufa se comparado a outras fontes renováveis.

A determinação de lignina na palha de milho por hidrólise ácida tem como pré-requisito a remoção dos extrativos devido aos inconvenientes comentados acima. Portanto, após retirada destes compostos e secagem ao ar, a amostra ficou apta para as demais etapas.

O teor de lignina da palha de milho está segmentado em fração solúvel e insolúvel em ácido. A fração solúvel é quantificada por espectrofotometria no ultravioleta em condições já otimizadas pelo NREL que estão citadas na seção 4.3.6 (SLUITER, A *et al.*, 2008). Compreende compostos fenólicos como ácidos p-cumárico, ferúlico e cafeico e, devido ao comprimento de onda utilizado, o NREL afirma que há mínima interferência de compostos provenientes da degradação dos carboidratos, tais como furfural e hidroximetilfurfural (SOTO *et al.*, 2011). De acordo com a Tabela 4, o teor total de lignina obtido foi de 9,67%, sendo que a fração solúvel corresponde a 3,00% e a fração insolúvel a 6,67% da massa total de amostra utilizada na hidrólise. É um valor semelhante ao encontrado na literatura, entretanto, podem ocorrer variações na composição dependendo do método de extração utilizado (GAO PEIJI *et al.*, 1997). Da fração de lignina solúvel podem ser separados e purificados compostos de valor agregado para indústrias de fármacos e alimentícia, por exemplo. O resíduo sólido do processo é a lignina insolúvel em ácido, que pode ser utilizada diretamente em compósitos ou ser tratada para obtenção de suas frações de menor massa molecular. Em relação ao aspecto físico dessa fração, foi possível verificar a mudança de coloração devido a carbonização causada pelo H₂SO₄ concentrado e o tamanho de partícula, que se apresentou mais cominuída.

Neste trabalho, a determinação de carboidratos é imprescindível pois tem relação direta com o grau de solubilização da biomassa pelo ácido sulfúrico. Como pode ser visto na Tabela 4, os carboidratos e a lignina somam 96% da massa de palha de milho. Portanto, a medida de açúcares se torna um parâmetro indicativo da eficiência da hidrólise, a qual tem como objetivo obter a lignina como um resíduo do processo. A quantificação de glicose, xilose e arabinose foi feita de acordo com o método mencionado na seção 4.3.8 (Quantificação de carboidratos). O procedimento descrito pelo NREL também considera os monômeros de manose e galactose no hidrolisado como açúcares quantificáveis, porém, muitas pesquisas não os enfatizam

devido ao baixo rendimento destes açúcares (LIU *et al.*, 2012). Neste trabalho, não foi possível separá-los pelo método cromatográfico utilizado pois houve coeluição de ambos os açúcares com a xilose, impossibilitando a quantificação dos mesmos. Os demais monômeros (glicose, xilose e arabinose) foram quantificados e convertidos por meio de um fator de correção anidro em suas formas oligoméricas. Sendo assim, os teores de glucano, xilano e arabinano obtidos foram, respectivamente, $47,04 \pm 0,24\%$, $33,67 \pm 0,11\%$ e $5,97 \pm 0,12\%$ para a palha de milho. Há trabalhos que mencionam a relação direta entre os oligômeros e suas formas poliméricas, admitindo, por exemplo, que o teor de glucano é referente a porcentagem de celulose na biomassa, enquanto os teores de xilano e arabinano podem ser contabilizados como hemicelulose (ZENG *et al.*, 2014). Entretanto, o NREL assume que seriam necessários mais detalhes sobre as ligações estruturais para atribuir as formas oligoméricas às suas frações celulósicas e hemicelulósicas.

Para realizar o balanço de massa do processo foram considerados os teores de carboidratos, lignina, cinzas e proteínas, totalizando 102,40% da biomassa livre de extrativos.

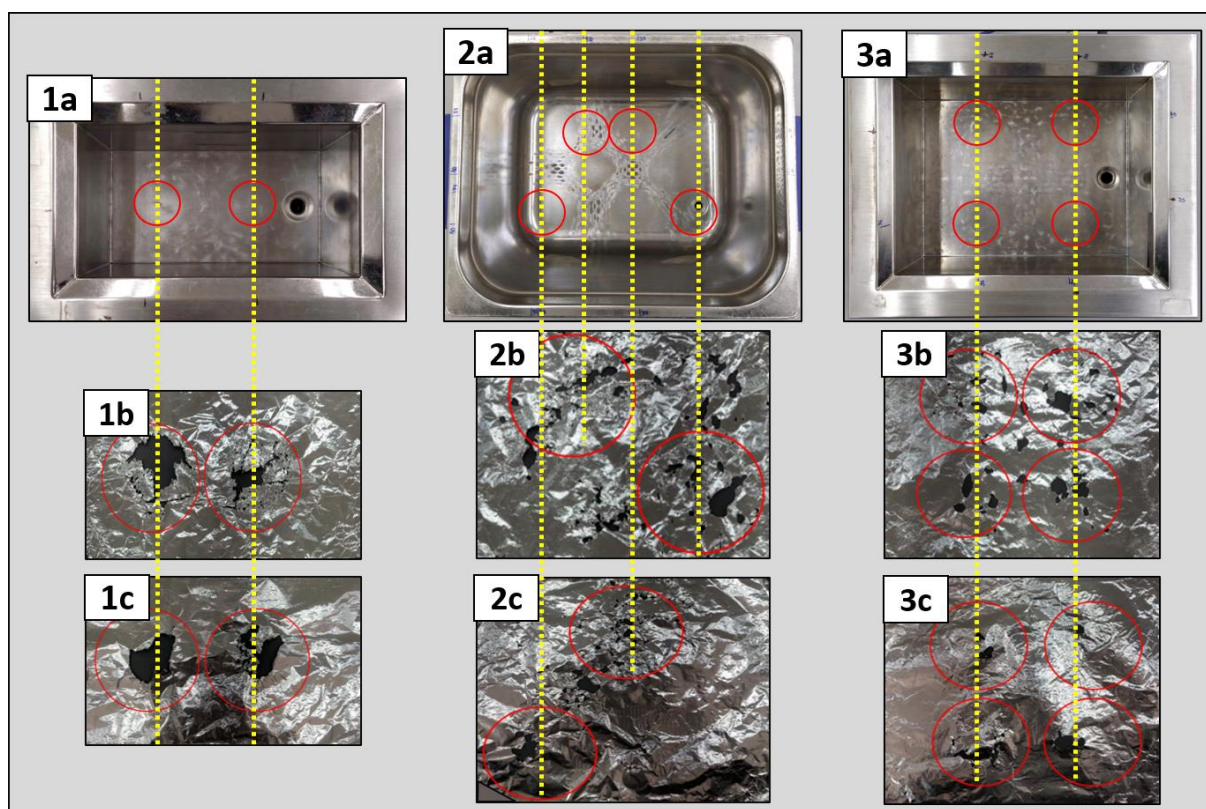
5.2 MAPEAMENTO DOS BANHOS ULTRASSÔNICOS

Existem diversas formas de estimar qualitativa ou quantitativamente quais são as zonas de cavitação ativas em um reator sonoquímico. Entre elas destacam-se o mapeamento térmico, medição com hidrofone e erosão de papel alumínio (MERONI *et al.*, 2022). Entretanto, este último é o método de menor custo e boa visualização. Consiste na disposição de uma folha de alumínio com a mesma largura e comprimento da cuba sob a superfície da água, bem como exemplificado na Figura 6 (1a, 2a e 3a). Como consequência da cavitação, são percebidas perfurações na folha nos locais onde a energia ultrassônica é mais intensa.

Sendo assim, antes do início dos experimentos foram feitos os mapeamentos dos banhos ultrassônicos, a fim de observar os locais onde a energia liberada era mais intensa. Esse procedimento consistiu em selecionar os pontos onde a folha de alumínio foi perfurada pela ação dos microjatos para o posicionamento dos frascos reacionais nos banhos, como mostram as linhas pontilhadas.

Como pode ser observado na Figura 6, o banho ultrassônico que opera em 25 e 45 kHz (1b e 1c), bem como aquele operando em 35 e 130 kHz (3b e 3c) possuem os mesmos locais de propagação máxima do ultrassom. O oposto ocorre com o banho de 37 e 80 kHz (2b e 2c), que possui pontos diferentes de máxima intensidade quando a frequência de trabalho é alternada.

Figura 6 - Medição da intensidade do ultrassom com folha de alumínio para banhos ultrassônicos operando em 1b) 25 kHz; 1c) 45 kHz; 2b) 37 kHz; 2c) 80 kHz; 3b) 35 kHz e 3c) 130 kHz



Fonte: Autor (2022).

5.3 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA ULTRASSÔNICA

Após a escolha dos locais de posicionamento dos frascos em cada sistema, a avaliação da frequência ultrassônica pôde ser realizada. Na Figura 7 são apresentados os três banhos utilizados nesta e nas avaliações posteriores.

Figura 7 - Banhos ultrassônicos com frequências de a) 25 e 45 kHz; b) 37 e 80 kHz e c) 35 e 130 kHz.



Fonte: Autor (2022).

Conforme mostrado na Tabela 5, estes banhos possuem volumes internos e potências nominais diferentes e operam em duas frequências de trabalho, totalizando 6 frequências investigadas.

Tabela 5 - Condições operacionais dos banhos ultrassônicos utilizados.

Frequência, kHz	Volume, L	Potência Nominal, W	Modelo
25 e 45	3,5	100	TI-H-5
37 e 80	9,0	330	P120H
35 e 130	8,6	200	TI-H-10

Fonte: Autor (2022).

Cabe ressaltar que a potência útil do equipamento geralmente representa somente 10 - 40% da potência nominal, visto que há perdas de transformação de energia elétrica em energia mecânica. Para obter valores de densidade de potência no banho ultrassônico, basta relacionar a potência dissipada por litro de solução sonicada. Portanto, para a mesma quantidade de energia liberada, volumes menores são preferíveis pois aumentam a densidade de potência no reator (LUO *et al.*, 2014)

Para a realização da hidrólise foram seguidas as condições determinadas no procedimento padrão do NREL. Adicionalmente foi empregado o US, bem como descrito na seção 4.3.10 (Deslignificação assistida por ultrassom). A solução resultante da hidrólise ácida foi utilizada na determinação de lignina solúvel e carboidratos de acordo com os métodos descritos nas seções 4.3.6 (Teor de lignina solúvel) e 4.3.8 (Quantificação de carboidratos), respectivamente. Já o resíduo sólido foi empregado na quantificação de lignina insolúvel em ácido, como citado no item

4.3.7 (Teor de lignina insolúvel e total). Os teores de cada fração da lignina obtidos nas frequências avaliadas estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Teores de lignina obtidos com banhos ultrassônicos operando em 50% de amplitude e com o procedimento padrão (NREL) (média \pm desvio padrão, n = 3).

Banho US	Lignina Solúvel, %*	Lignina Insolúvel, %*	Total, %*
25 kHz	2,98 \pm 0,01 ^a	7,25 \pm 0,13 ^a	10,24 \pm 0,14 ^a
35 KHz	2,27 \pm 0,06 ^b	7,83 \pm 0,05 ^b	10,10 \pm 0,11 ^a
37 kHz	2,12 \pm 0,04 ^b	8,61 \pm 0,16 ¹	10,73 \pm 0,20 ^b
45 kHz	2,73 \pm 0,07 ¹	7,94 \pm 0,08 ^b	10,67 \pm 0,15 ^b
80 kHz	2,25 \pm 0,08 ^b	7,96 \pm 0,12 ^b	10,22 \pm 0,20 ^a
130 kHz	2,93 \pm 0,09 ^a	7,24 \pm 0,06 ^a	10,17 \pm 0,15 ^a
NREL	3,00 \pm 0,02 ^a	6,67 \pm 0,04 ¹	9,67 \pm 0,06 ¹

* Para cada coluna analisada separadamente, os valores sinalizados com a mesma letra sobrescrita não apresentam diferença significativa entre si.

¹ Para cada coluna analisada separadamente, os valores sinalizados apresentam diferença significativa quando comparados aos demais.

Fonte: Autor (2022).

Sabendo que o teor total de lignina na palha de milho determinado pelo procedimento de referência (NREL) é de 9,67%, conclui-se que o ultrassom viabilizou a extração da lignina, pois todos os valores encontrados foram próximos àquele obtido pelo NREL. Cabe ressaltar que ao considerar os teores totais de lignina e fazendo o uso do teste ANOVA (do inglês *Analysis of Variance*) com um intervalo de 95% de confiança, todos os resultados apresentam diferença significativa quando comparado à referência.

Como observado na Tabela 6, os sistemas operando em 25, 45 e 130 kHz solubilizaram as maiores quantidades de lignina, enquanto os banhos de 37, 45 e 80 kHz mantiveram maior porcentagem da lignina na forma de resíduo sólido. Nesta avaliação não foi realizada a quantificação dos açúcares para verificar se a hidrólise havia sido completa e se somente a lignina estava sendo contabilizada nos cálculos de extração. Contudo, percebe-se que não há uma ordenação nos resultados conforme há o aumento da frequência ultrassônica. Isso leva a conclusão que, nas condições que os experimentos foram feitos, a variação da frequência não exerceu papel determinante na deslignificação da palha de milho.

Apesar disso, foi necessário escolher uma faixa de frequência para dar sequência aos experimentos de hidrólise ácida assistida por ultrassom e, por isso, outro artifício precisou ser utilizado para auxiliar na decisão. Nesse caso, a medida da potência dissipada no meio pelo ultrassom foi considerada. Ela foi mensurada através da calorimetria, fornecendo dados sobre a quantidade de energia propagada no meio e disponível para a absorção pela amostra.

5.4 TESTE CALORIMÉTRICO

Esse experimento foi realizado a fim de mensurar os valores de potência dissipada pelos banhos ultrassônicos, visto que os valores de potência nominal não consideram as condições do experimento, volume do banho, além de atenuação de energia pelas paredes do reator, transdutores e ar. Estas perdas ocorrem no momento que as ondas ultrassônicas são propagadas no meio e a energia é transferida através do líquido. (SON *et al.*, 2012). Por esse motivo, a conversão de energia elétrica em energia mecânica precisa ser devidamente correlacionada.

Considera-se que nos primeiros instantes de sonicação não há perdas de transformação da energia elétrica em energia mecânica ou cinética e que toda a energia incidente na amostra é convertida em calor. Portanto, através da medida de temperatura é possível quantificar a eficiência de transferência de energia elétrica para o reator sonoquímico (LUO *et al.*, 2014; MERONI *et al.*, 2022).

Foram calculados, de acordo com as Equações 9 e 10 presentes na seção 4.3.11 (Calorimetria), os valores da potência dissipada e densidade de potência por calorimetria para todos os sistemas avaliados. Na Tabela 7 é possível verificar os dados obtidos a partir do teste calorimétrico em todos os banhos ultrassônicos.

Tabela 7 - Valores de potência nominal, potência dissipada e densidade de potência nos banhos de ultrassom com amplitude de 50%.

Banho US	Potência Nominal, W	Potência Dissipada, W	Densidade de Potência, W dm⁻³
25 kHz	100	1,08	361
35 KHz	200	0,34	112
37 kHz	330	0,49	163
45 kHz	100	0,63	209
80 kHz	330	0,09	31
130 kHz	200	0,17	56

Fonte: Autor (2022).

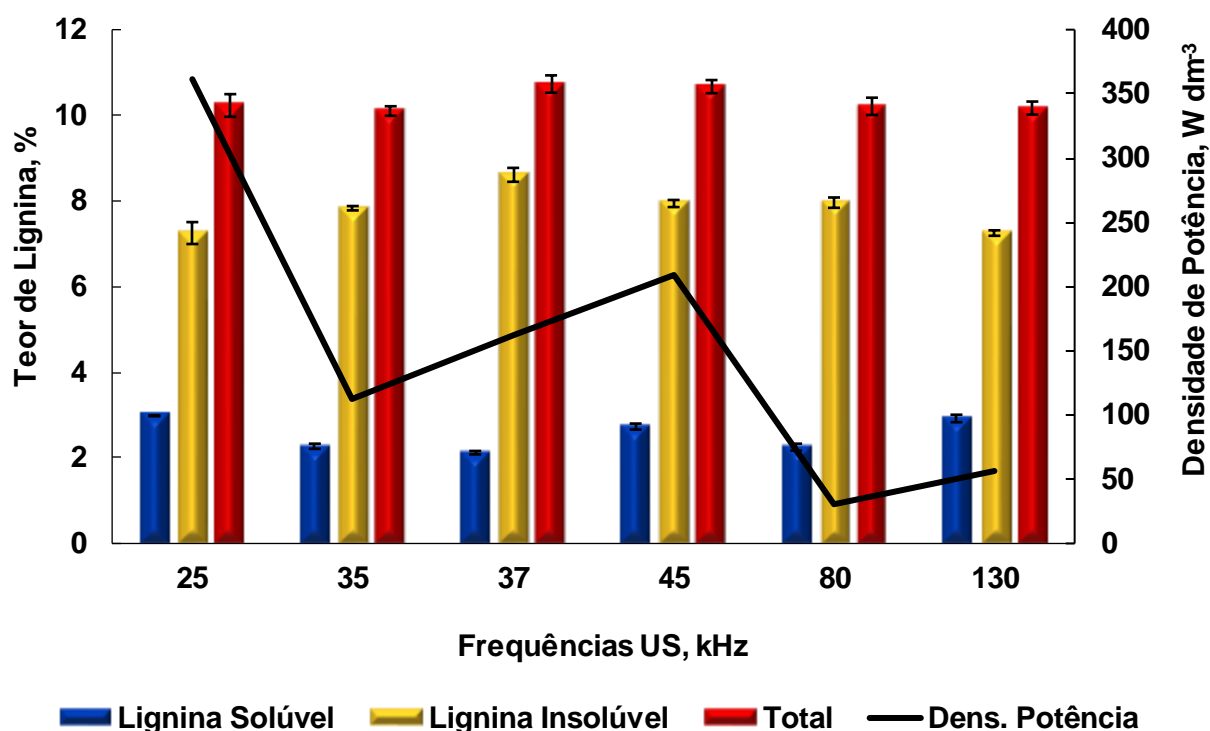
Foi considerada a variação de temperatura durante um intervalo de sonicação de 1 minuto para todos os sistemas. Pode-se observar que as potências dissipadas no meio oscilam de 0,09 a 1,08 W. A partir disso, foi possível perceber que cada sistema fornece energia para o meio em quantidades diferentes que dependem das atenuações citadas anteriormente e do volume da cuba do banho.

Para melhor elucidação da relação entre frequência e potência de US (Tabela 7) com os teores de lignina extraídas da palha de milho (Tabela 6), foi construído um gráfico que está disposto na Figura 8.

A partir do gráfico é possível observar que o banho de 25 kHz é o sistema que possui maior densidade de potência (razão entre potência dissipada e volume do reator), mas não é o que mais extrai lignina se comparado aos outros sistemas. De forma oposta, os banhos com maior volume (80 e 130 kHz) resultaram nas menores densidades de potência.

Embora o sistema de 37 kHz tenha alcançado o maior teor de lignina entre os demais, até o momento não estava sendo feita a caracterização da fração solúvel para verificar se a constituição do resíduo restante era somente lignina ou se possuía açúcares não solubilizados gerando o teor superestimado para lignina. Por esse motivo, optou-se por considerar o sistema que obteve o teor de deslignificação próximo ao valor padrão (NREL).

Figura 8 - Teores de lignina e valores de densidade de potência em cada frequência de US (média \pm desvio padrão, n = 3).



Fonte: Autor (2022).

Sendo assim, de acordo com a Tabela 6, o banho de 35 kHz foi escolhido para dar seguimento nos experimentos. Além dele, o sistema operando em 25 kHz também foi selecionado a fim de observar se a elevada potência dissipada refletiria em teores de deslignificação satisfatórios nas condições avaliadas posteriormente.

5.5 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE ASSISTIDA POR ULTRASSOM

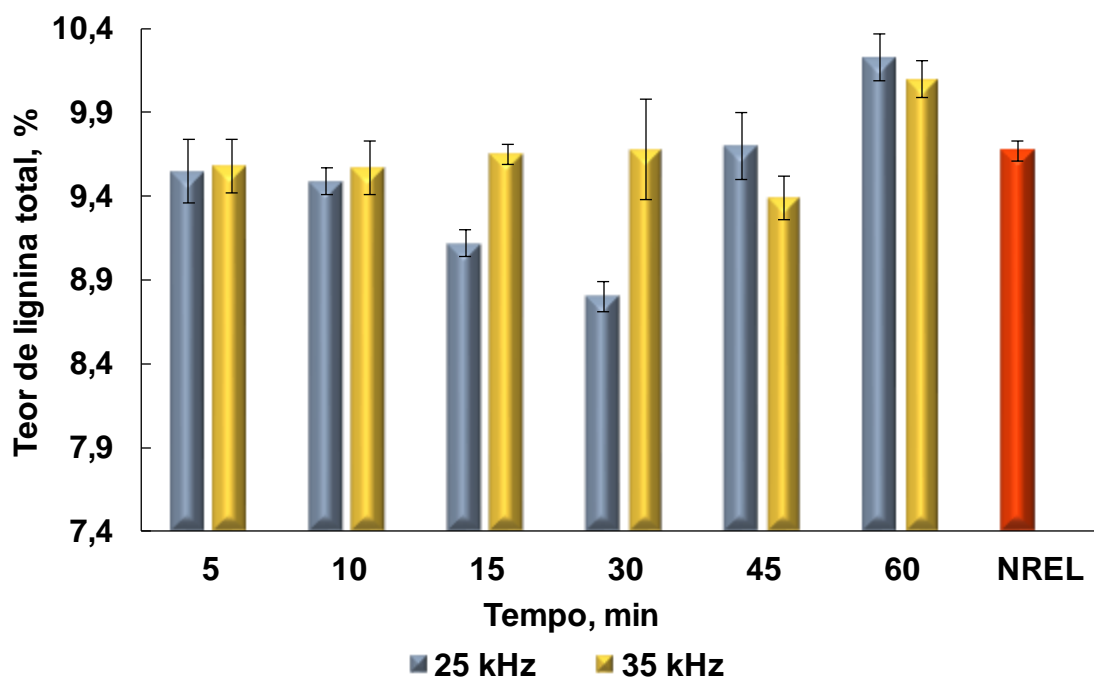
O tempo padronizado pelo NREL na primeira etapa de hidrólise foi de 60 minutos. Contudo, tempos de 5, 10, 15, 30 e 45 minutos também foram avaliados a fim de observar se o ultrassom beneficiaria a deslignificação da palha de milho em tempos menores, mantendo a eficiência do processo. Devido aos valores obtidos no teste calorimétrico, os banhos ultrassônicos operando nas frequências de 25 e 35 kHz com 50% de amplitude foram selecionados para estes experimentos. Os demais parâmetros experimentais se mantiveram de acordo com a norma. Na Figura 9 estão apresentados os resultados obtidos para os variados tempos de deslignificação nos

banhos de 25 e 35 kHz em comparação com o valor do NREL, representado pela linha horizontal preta.

Observando a Figura 9 é possível perceber que 15 minutos de hidrólise com a aplicação do ultrassom em 35 kHz foram suficientes para remover a mesma quantidade de lignina que o método padrão por 60 minutos. Já hidrólise em 25 kHz possibilitou a mesma porcentagem de deslignificação que o NREL apenas em 45 minutos de sonicação.

De acordo com o teste ANOVA em intervalo de 95% de confiança, todos os tempos de sonicação em 35 kHz resultaram em teores de lignina total sem diferença significativa quando comparados ao NREL. Dentre os tempos estudados para a frequência de 25 kHz, somente 30 minutos de sonicação apresenta diferença significativa em relação ao NREL.

Figura 9 - Avaliação do tempo de hidrólise com banhos de 25 e 35 kHz com 50% de amplitude na deslignificação da palha de milho (média \pm desvio padrão, n = 3).



Fonte: Autor (2022).

Percebe-se um decaimento acentuado no teor de lignina no tempo de 15 e 30 minutos para a frequência de 25 kHz, provavelmente devido a heterogeneidade da amostra. Uma ligeira diminuição também foi observada com o uso da frequência de 35 kHz, porém no tempo de 45 minutos. Um estudo realizado por BUSSEMAKER *et al.*

(2013) também constatou o declínio e posterior aumento do teor de lignina no decorrer do tempo de sonicação da casca de girassol. A repolimerização da lignina solúvel na fração insolúvel foi uma das hipóteses apresentadas para justificar este comportamento. Além disto, os autores consideraram que o ultrassom pode interagir de forma diferente com as unidades H, G e S que formam a complexa cadeia da lignina, promovendo remoções não lineares (BUSSEMAKER *et al.*, 2013).

Embora ambas as frequências tenham obtido valores satisfatórios de deslignificação em diversos tempos, aqueles mais baixos são preferíveis devido a economia de recursos. Em razão disso, os tempos de extração de 5 e 10 minutos para 25 e 35 kHz receberam destaque.

Tendo em vista a dissipação de energia envolvida no uso de cada sistema pelo experimento de calorimetria (Figura 8), nota-se que o banho de 25 kHz libera 3 vezes mais energia no meio do que o banho de 35 kHz. No entanto, a elevada potência não representou extrações de lignina significativas, visto que ambos os sistemas obtiveram valores parecidos nos tempos de 5 e 10 minutos (Figura 9).

Se visto no âmbito energético, o banho de 35 kHz apresenta algumas vantagens em relação ao de 25 kHz para este estudo. Por exemplo, a viscosidade do H₂SO₄ na concentração de 72% é elevada e pode dificultar a passagem das ondas ultrassônicas. Portanto, é preciso empregar mais energia e, conseqüentemente, maior frequência para superar o limiar de cavitação. Além disso, ao utilizar frequências maiores são geradas mais bolhas de cavitação de tamanho menor com grande poder de penetração (CAPELO-MARTÍNEZ, 2009; MASON *et al.*, 2002).

Embora a diferença de frequência entre os dois sistemas estudados não seja expressiva, estes argumentos justificam os valores de deslignificação obtidos para o banho de 35 kHz, pois, mesmo liberando menos potência no meio, alcançou resultados tão bons quanto o sistema mais potente, operando a 25 kHz.

Ainda, ao observar a Tabela 6, constata-se que foi extraída menor quantidade de lignina solúvel com o sistema de 35 kHz, restando mais lignina insolúvel ao final do processo. Este resíduo sólido pode ser diretamente aplicado ou facilmente solubilizado em monômeros, enquanto a fração solúvel, também rica em açúcares, necessita passar por processos de separação e purificação que podem ser desvantajosos economicamente. Por estes motivos, o banho de 35 kHz foi o escolhido

para dar sequência aos experimentos, restando somente definir o melhor tempo de sonicação.

Nota-se que os teores de lignina extraídos em 35 kHz por 5 e 10 minutos apresentam valores semelhantes. Para decidir qual dos tempos deveria ser selecionado para as demais etapas do planejamento foi feita a quantificação de açúcares (glicose, xilose e arabinose) em cada uma das amostras a fim de avaliar a eficiência da hidrólise. Foram obtidos os valores de 72,51% e 86,01% de carboidratos totais solubilizados nos tempos de 5 e 10 minutos, respectivamente.

Ao considerar somente o teor de lignina total extraído pelo US em 5 minutos, há uma economia de tempo de 12 vezes se comparado com o teor de lignina total obtido com o método do NREL (60 min de hidrólise). Nessas condições, não há diferença significativa entre os valores de acordo com o teste ANOVA com um intervalo de 95% de confiança.

Entretanto, ao avaliar o teor de carboidratos extraídos, percebe-se que o tempo de 5 minutos é insuficiente para hidrolisar todos os carboidratos da biomassa, visto que o método padrão solubilizou 86,68% deles. Isso representa uma diferença de 14,17% em massa de palha de milho que foi contabilizada como lignina, já que estes açúcares permaneceram no resíduo sólido. Além disso, foi possível observar uma coloração mais clara do resíduo quando comparada com o tempo de 10 minutos de US, indicando qualitativamente que a hidrólise em 5 minutos não foi completa.

Ao comparar a eficiência das hidrólises obtidas com o US por 10 minutos e o NREL, notou-se a solubilização praticamente completa dos carboidratos, uma vez que o tratamento com US por 10 minutos em 35 kHz resultou em teor de 86,01% de açúcares monoméricos.

Sendo assim, este tempo e frequência foram selecionados para as demais etapas do planejamento experimental com economia de tempo de 6 vezes e mesma eficiência de deslignificação e solubilização de carboidratos em relação ao método convencional. Essa redução de tempo pode estar relacionada com os efeitos da cavitação acústica, tais como as ondas de choque, microjatos e microfluxos. Esses fenômenos intensificam o contato entre o ácido e a palha de milho, facilitando a solubilização e desorganização da biomassa.

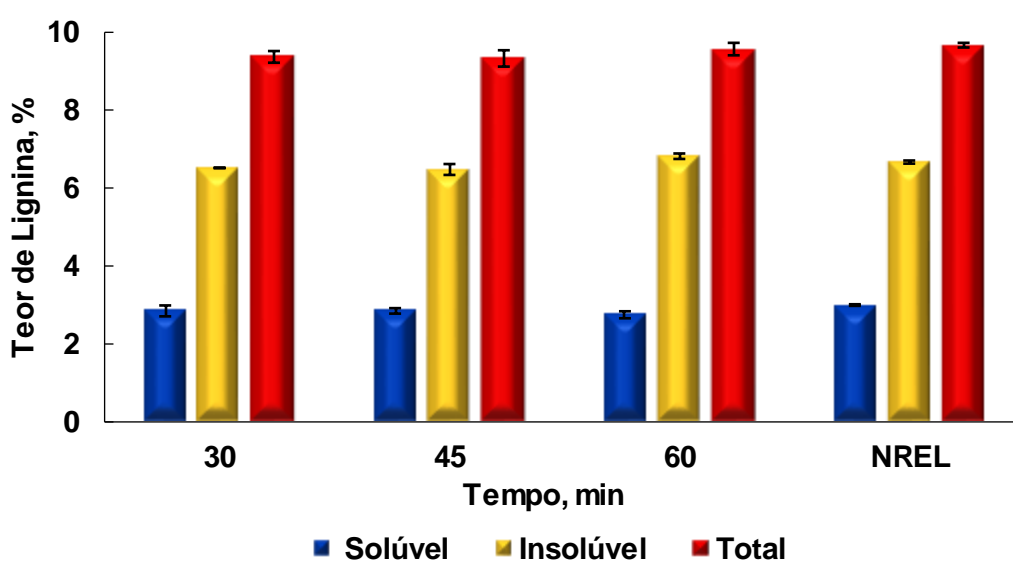
5.6 AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE ULTRASSÔNICA E TEMPO DE AUTOCLAVE

A avaliação de variadas amplitudes de US foi feita com o intuito de melhorar ou manter a eficiência de extração de lignina já alcançada, porém tornando brandas outras condições do processo, tal como o tempo de hidrólise em autoclave. Nesse sentido, foram estudadas amplitudes maiores do que a fixada até o momento (50%) para compensar a diminuição do tempo de autoclavagem (etapa a ser avaliada).

Foi feito um paralelo entre os teores de lignina extraídos e a porcentagem de açúcares solubilizados na palha de milho em cada amplitude de US testada (50, 75 e 100%). Estes dados se complementam neste estudo, visto que a solubilização dos carboidratos indica se os teores de lignina obtidos são provenientes de hidrólise completa ou incompleta.

Na Figura 10 é possível visualizar os teores de lignina solúvel, insolúvel e total em cada tempo de hidrólise em autoclave testada (30, 45 e 60 minutos) com amplitude de US fixada em 50%. Cabe ressaltar que a primeira etapa de hidrólise foi realizada nas condições definidas anteriormente (aplicação de US a 35 kHz por 10 minutos com 300 mg de amostra e 3 mL de H₂SO₄ 72% a 30 °C) e que a temperatura de autoclavagem não foi alterada neste estudo (121 °C).

Figura 10 - Avaliação dos tempos de autoclavagem na extração de lignina em 10 minutos de hidrólise com 35 kHz e 50% de amplitude (média \pm desvio padrão, n = 3).



Fonte: Autor (2022).

Na Tabela 8 podem ser visualizados os teores de carboidratos oligoméricos solubilizados em cada condição experimental da Figura 10.

Tabela 8 - Avaliação da produção de açúcares em diferentes tempos de autoclavagem e 50% de amplitude na hidrólise (média \pm desvio padrão, n = 3).

Produção de açúcares em 50% de amplitude				
Tempo autoclave, min	Glucano, %	Xilano, %	Arabinano, %	Total, %
30	37,55 \pm 0,18	35,97 \pm 0,42	6,72 \pm 0,01	80,24 \pm 0,61
45	42,81 \pm 0,36	36,19 \pm 0,37	6,57 \pm 0,12	85,57 \pm 0,85
60	45,16 \pm 0,49	34,23 \pm 0,41	6,62 \pm 0,05	86,01 \pm 0,95
NREL	47,04 \pm 0,24	33,67 \pm 0,11	5,97 \pm 0,12	86,68 \pm 0,46

Fonte: Autor (2022).

Ao observar a Figura 10, percebe-se que o teor de lignina insolúvel aumenta conforme a hidrólise em autoclave fica mais longa. Isto pode ser causado pela repolimerização da cadeia amorfa de lignina, que em menores tempos estava presente na fração solúvel.

Embora o teor de lignina extraído da palha de milho no tempo de 30 minutos de autoclavagem seja próximo ao valor de referência (NREL), nota-se que parte da massa do resíduo também contém açúcares não solubilizados. De acordo com os dados da Tabela 8, o teor total de carboidratos obtido após a hidrólise ácida da palha de milho com o método referência foi de 86,68%. No entanto, quando a hidrólise assistida por US foi realizada em tempo de autoclavagem de 30 minutos, obteve-se a solubilização de 80,24% dos carboidratos. Portanto, aproximadamente 6% do total de açúcares permaneceu no resíduo sólido e foi contabilizado como lignina devido ao menor tempo acarretar em hidrólise incompleta da biomassa.

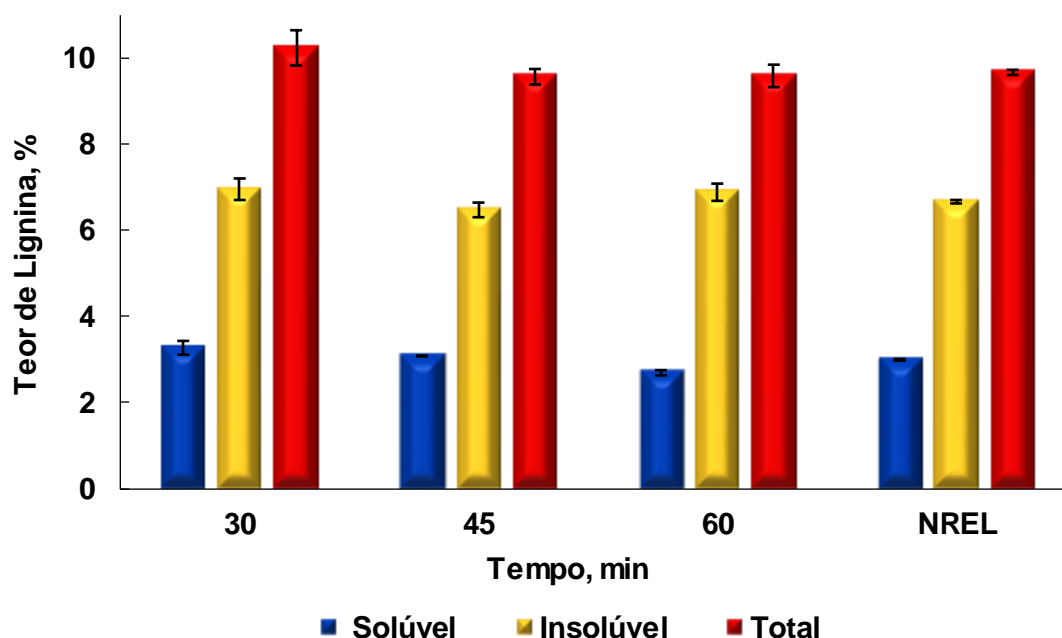
Já nos tempos de autoclavagem de 45 e 60 minutos, pode-se afirmar que houve a hidrólise praticamente completa dos carboidratos e que o resíduo insolúvel é composto apenas por lignina.

Além disso, dentre todos os açúcares, a glicose é a que apresenta maior interesse industrial, pois é vastamente empregada na fabricação de biocombustíveis. Portanto, além do tempo de autoclavagem de 60 minutos possibilitar a melhor

extração de lignina, também viabilizou a maior solubilização da glicose em comparação aos demais tempos estudados. Isto é evidente pois a celulose possui a maior parte da cadeia polimérica altamente organizada (exceto pela região amorfa), necessitando de elevada temperatura e tempo para ocasionar sua fragmentação.

Um comportamento semelhante é observado com a aplicação do ultrassom na amplitude de 75%. Na Figura 11 são mostrados os teores de lignina solúvel, insolúvel e total em cada tempo de hidrólise em autoclave testada (30, 45 e 60 minutos).

Figura 11 - Avaliação dos tempos de autoclavagem na extração de lignina em 10 minutos de hidrólise com 35 kHz e 75% de amplitude (média \pm desvio padrão, n = 3).



Fonte: Autor (2022).

De acordo com a Figura 11, o teor de lignina solúvel diminuiu significativamente conforme o tempo de autoclavagem aumenta, bem como observado com a amplitude de 50%. Além disso, essa fração é mais solubilizada com o uso de 75% de amplitude se comparada com a anterior, de 50%. Sabe-se que ondas com maiores amplitudes transportam mais energia. Portanto, a agitação mais vigorosa do meio ocasionada pelas ondas de choque, microjatos e microfluxos pode ter desorganizado em maior escala a estrutura da lignina e, por isso, maior solubilização foi observada com o emprego da amplitude maior.

A fragmentação superior da lignina em fração solúvel impactou diretamente nos teores de lignina insolúvel, visto que a porcentagem de deslignificação obtida com a

amplitude de 75% permaneceu praticamente a mesma da condição anterior (amplitude de 50%).

O perfil de solubilização dos carboidratos, mostrado na Tabela 9, manteve-se similar à condição anterior. Em menores tempos de autoclavagem foi observado menor produção de açúcares. O melhor desempenho na deslignificação da palha de milho e na solubilização dos carboidratos foi obtido com o tempo de 60 minutos. Vale ressaltar que o aumento da amplitude reduziu a cristalinidade da celulose e hemicelulose, visto que os valores totais de produção de açúcares foram ligeiramente maiores em 75% de amplitude do que em 50% no tempo de 60 minutos.

Tabela 9 - Avaliação da produção de açúcares em diferentes tempos de autoclavagem e 75% de amplitude na hidrólise (média \pm desvio padrão, n = 3).

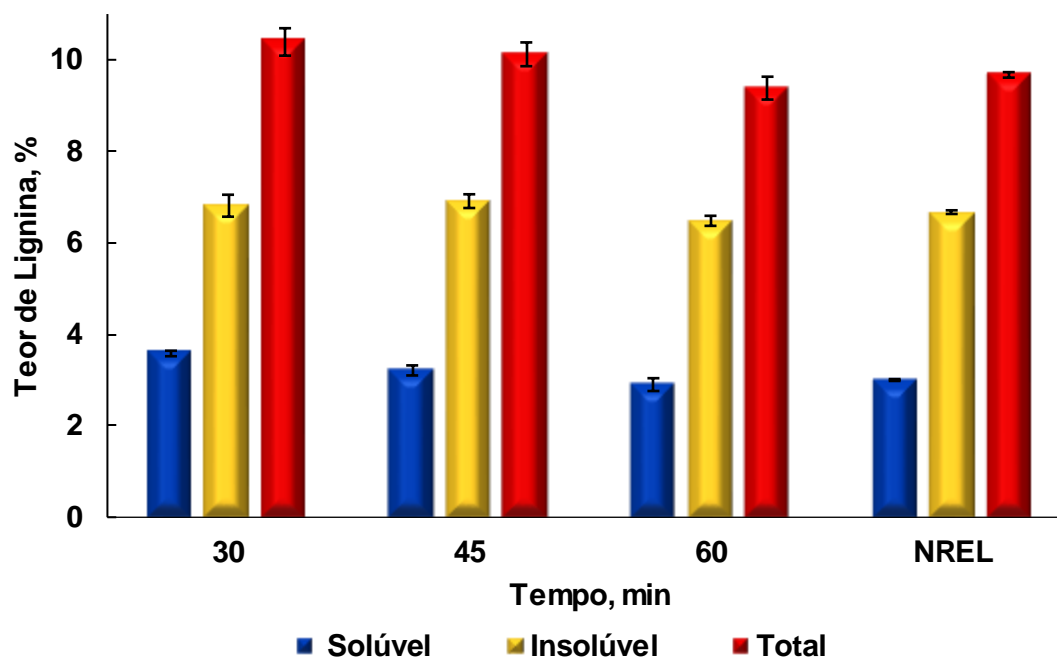
Produção de açúcares em 75% de amplitude				
Tempo autoclave, min	Glucano, %	Xilano, %	Arabinano, %	Total, %
30	33,72 \pm 0,10	32,21 \pm 0,67	6,24 \pm 0,36	72,17 \pm 1,13
45	41,32 \pm 1,04	32,27 \pm 1,11	6,10 \pm 0,25	79,69 \pm 2,40
60	46,37 \pm 0,14	34,67 \pm 0,14	5,97 \pm 0,11	87,01 \pm 0,39
NREL	47,04 \pm 0,24	33,67 \pm 0,11	5,97 \pm 0,12	86,68 \pm 0,46

Fonte: Autor (2022).

Constam na Figura 12 os teores de lignina solúvel, insolúvel e total em cada tempo de hidrólise em autoclave testada (30, 45 e 60 minutos) com amplitude de US fixada em 100%.

Ao observar a Figura 12, percebe-se a redução do teor total de lignina na amostra, visto que a hidrólise não foi completa nos tempos de 30 e 45 minutos de autoclave e os açúcares foram contabilizados como lignina. No tempo de autoclavagem de 60 minutos é possível notar a pequena diminuição no teor de lignina solúvel, provavelmente devido à deposição da lignina na fração insolúvel.

Figura 12 - Avaliação dos tempos de autoclavagem na extração de lignina em 10 minutos de hidrólise com 35 kHz e 100% de amplitude (média \pm desvio padrão, n = 3).



Fonte: Autor (2022).

Estão dispostos na Tabela 10 os teores de carboidratos solubilizados em cada condição experimental da Figura 12, representados na forma oligomérica.

Tabela 10 - Avaliação da produção de açúcares em diferentes tempos de autoclavagem e 100% de amplitude na hidrólise (média \pm desvio padrão, n = 3).

Produção de açúcares em 100% de amplitude				
Tempo autoclave, min	Glucano, %	Xilano, %	Arabinano, %	Total, %
30	36,45 \pm 0,36	29,81 \pm 0,11	5,71 \pm 0,12	71,97 \pm 0,60
45	41,25 \pm 0,25	35,14 \pm 0,41	6,98 \pm 0,64	83,37 \pm 1,30
60	51,39 \pm 0,16	34,01 \pm 0,28	6,27 \pm 0,13	91,67 \pm 0,56
NREL	47,04 \pm 0,24	33,67 \pm 0,11	5,97 \pm 0,12	86,68 \pm 0,46

Fonte: Autor (2022).

Além disso, nota-se que os teores de lignina solúvel obtidos em 100% de amplitude são maiores do que os alcançados em 50 e 75% de amplitude. Isto justifica-se pelo aumento de energia propagada pelo US e pela intensificação dos efeitos físicos que causam a desorganização da estrutura lignocelulósica, tais como os microfluxos e microjatos. O aumento da amplitude também pode facilitar a penetração do ácido sulfúrico (bastante viscoso) na amostra, por isso pode ter solubilizado em maior extensão a lignina.

Este mesmo efeito pode ter causado a máxima solubilização dos carboidratos entre todas as condições estudadas (91,67%). Houve redução considerável na cristalinidade da celulose e hemicelulose pois notou-se maior fragmentação das mesmas devido às intensas ondas de choque existentes nessa condição. Nota-se que a hidrólise assistida por ultrassom resultou em rendimento de glucano superior ao atingido pelo método padrão. No entanto, o valor se encontra na faixa adequada para a palha de milho pré-tratada, que varia de 42 a 57% segundo a literatura (GAO PEIJI *et al.*, 1997; SANTOS, 2014).

Portanto, após essa avaliação detalhada da influência da amplitude ultrassônica e do tempo de hidrólise em autoclave na deslignificação da palha de milho, foi possível concluir que 100% de amplitude e 60 minutos de autoclavagem foram as melhores condições para a finalidade mencionada.

Os teores de lignina solúvel e insolúvel obtidos com o US não têm diferença significativa daqueles extraídos com o procedimento padrão, segundo o teste t de *student* em intervalo de 95% de confiança.

Cabe destacar que além da condição otimizada com US possibilitar a mesma remoção da lignina que o método padrão, também viabilizou a recuperação total de carboidratos da palha de milho. A totalidade de celulose e hemicelulose presentes na biomassa, antes do pré-tratamento, foram convertidos em açúcares fermentescíveis úteis para fabricação de biocombustíveis e produtos de alto valor agregado para diversas indústrias.

5.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÁCIDA

Após a otimização dos tempos das hidrólises e da frequência e amplitude ultrassônica, restou avaliar a concentração de H₂SO₄ empregada no processo de

hidrólise. Não foram encontradas concentrações diferentes de 72% na literatura para este tipo de aplicação, portanto, os valores foram escolhidos arbitrariamente. Visando tornar esta condição a mais branda possível, o objetivo inicial consistiu em testar 4 concentrações mais diluídas que a utilizada. Por isso, os valores foram reduzidos a cada 1/4 partindo da concentração inicial. Logo, as concentrações de 18, 36, 54 e 72% foram planejadas para avaliação. Em um primeiro momento foi estudada a utilização da segunda maior concentração de H₂SO₄ e, caso fosse eficiente, as mais diluídas seriam testadas.

No entanto, foi observado que a condição empregando 54% de H₂SO₄ não hidrolisou eficientemente os carboidratos, o que resultou em um valor superestimado para lignina, como pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11 - Teor de lignina após hidrólise com H₂SO₄ a 54% (média ± desvio padrão, n = 3).

Fração lignina	Teor, %
Solúvel	2,48 ± 0,07
Insolúvel	47,52 ± 0,13
Total	50,00 ± 0,20

Fonte: Autor (2022).

A partir destes resultados percebe-se que os carboidratos se mantiveram ligados à lignina (fração insolúvel) pois a condição ácida não foi suficiente para hidrolisá-los. Sendo assim, as concentrações mais diluídas também não seriam eficientes e por isso não foram testadas.

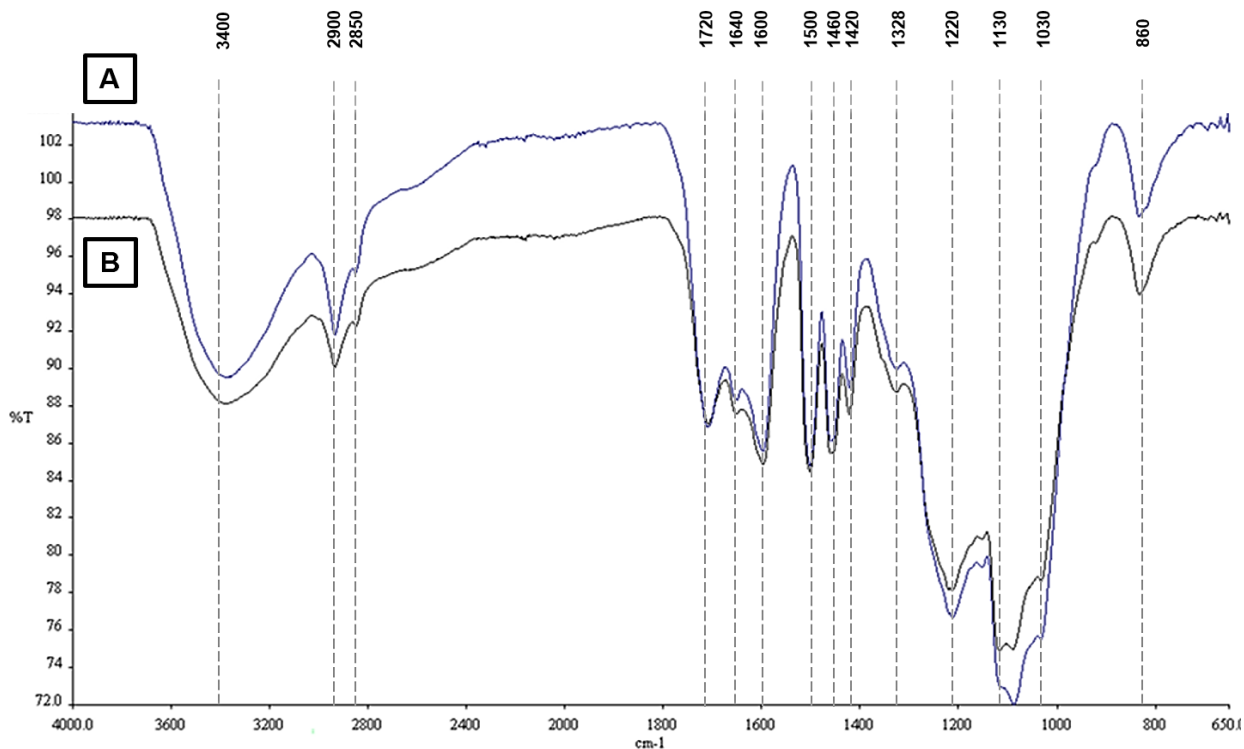
5.8 CARACTERIZAÇÃO POR FT-IR

Os grupos funcionais característicos da lignina foram avaliados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e a identificação dos mesmos foi baseada em comparações do espectro obtido com aqueles disponíveis na literatura.

Na Figura 13 estão apresentados os dois espectros da lignina obtidos e seus respectivos números de onda. O espectro A (em azul) refere-se à condição otimizada

da hidrólise ácida assistida por ultrassom, enquanto o espectro B (em preto) remete-se à hidrólise pelo tratamento convencional.

Figura 13 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) obtidos para a lignina em a) 10 minutos de hidrólise com 35 kHz e 100% amplitude e 60 minutos de autoclave e b) NREL.



Fonte: Autor (2022).

Uma banda forte observada em torno de 3400 cm⁻¹ é atribuída a vibrações de alongamento O-H de grupos fenólicos (STUART, 2004). A banda fraca em 2900 cm⁻¹ é atribuída às vibrações C-H do grupo metil de carboidratos (PAVIA *et al.*). Já a banda em 2850 cm⁻¹ pertence ao estiramento do grupamento metóxi ou vibrações de alongamento de ligação C-H de alcanos (JIN *et al.*, 2020). A banda em 1720 cm⁻¹ está relacionada com vibrações de alongamento de ligação éster entre a lignina e os carboidratos (YANG *et al.*, 2018). Bandas em 1640, 1600, 1500 e 1420 cm⁻¹ são mencionadas na literatura como vibrações de anel aromático. Deformações angulares de metil e metileno correspondem a banda em 1460 cm⁻¹.

Algumas bandas são características de vibrações dos anéis aromáticos siringil, guaiacil e hidroxifenil. Dentre elas, podem ser citadas as bandas em 1328 e 1200 cm⁻¹, que representam o estiramento C-O do anel siringil. Há também a banda

em 1130 cm^{-1} que corresponde a alongamento de éter alifático ou deformação da ligação C-H planar do anel aromático siringil. Além destas, as bandas em 1030 e 860 cm^{-1} caracterizam a deformação C-H no plano do anel aromático guaiacil e vibrações fora do plano C-H de anéis hidroxifenil e siringil (JIN *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020; RUNCANG SUN *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2018).

Embora a estrutura da lignina seja complexa e variada, pode-se notar a presença de vários grupamentos característicos da sua cadeia nos espectros adquiridos. É importante ressaltar que todas as bandas da lignina obtida com o método convencional também estão presentes no espectro da lignina proveniente da hidrólise com US. Isso significa que a condição otimizada com o US possibilitou a obtenção da lignina com as mesmas características estruturais que o NREL, porém, em menor tempo de hidrólise devido aos fenômenos da cavitação acústica.

5.9 CARACTERIZAÇÃO POR SEM

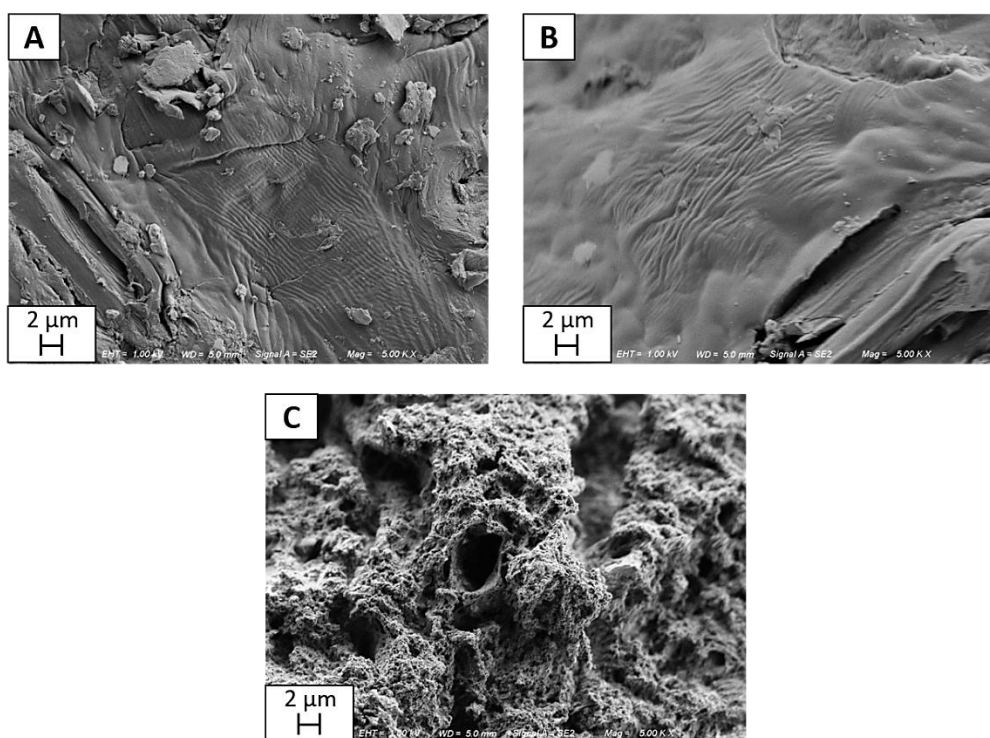
A análise por microscopia eletrônica de varredura (SEM) forneceu informações sobre a estrutura morfológica e topográfica da palha de milho. As imagens foram coletadas da amostra *in natura*, da palha livre de extrativos e da palha após a hidrólise ácida (NREL), como mostrado na Figura 14. Todas as imagens possuem magnificação de 5000 vezes.

Conforme mostrado na Figura 14A, a palha de milho não tratada apresentava partículas aderidas à superfície. Após a remoção de extrativos (Figura 14B), a palha de milho passou a ter aparência mais limpa e uniforme. Isso confirma que a etapa de extração destes materiais particulados, ceras e açúcares superficiais são extremamente importantes para as posteriores quantificações de lignina e carboidratos na biomassa.

Ao observar a Figura 14C, é possível verificar a modificação na superfície do resíduo antes e após os processos de hidrólise com H_2SO_4 a 72%. Percebe-se que restou somente uma rede porosa se comparada com a imagem anterior, o que indica a solubilização dos carboidratos da matriz. Portanto, pode-se considerar que o resíduo restante seja a lignina presente na parede vegetal que não foi afetada pela hidrólise ácida.

Não foi possível obter uma imagem da condição otimizada com o US (SEM em manutenção). Entretanto, sabe-se que a solubilização dos carboidratos na hidrólise assistida por US foi tão eficiente quanto a conseguida pelo método padrão (NREL). Logo, acredita-se que os aspectos morfológicos da lignina obtida pelos dois métodos seriam parecidos. Porém, é importante ressaltar que poderia ser notado na superfície da lignina uma desordem estrutural superior àquela observada nos experimentos seguindo o procedimento padrão, devido ao fenômeno da cavitação acústica.

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura para a) palha de milho *in natura*, b) palha de milho livre de extrativos e c) lignina após hidrólise ácida (NREL).



Fonte: Autor (2022).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, observou-se que o método de deslignificação assistida por ultrassom possibilitou a extração eficiente da lignina da palha de milho e com economia de tempo de 6 vezes na etapa de hidrólise ácida quando comparado ao método convencional (NREL). Ainda, verifica-se que o método proposto pode ser uma alternativa aos métodos de determinação de lignina já consolidados, uma vez que não houve diferença significativa entre os valores de ambos os métodos quando submetidos ao teste estatístico *t student* com intervalo de 95% de confiança.

Na otimização do processo de deslignificação foram avaliados parâmetros experimentais como frequência e amplitude do US, bem como a quantidade de energia dissipada no meio reacional pelo US (estimada pelo método calorimétrico). Além disso, o tempo de hidrólise ácida, tempo de hidrólise em autoclave e concentração ácida também foram investigados. Após o estudo de todos esses parâmetros, foram definidas as melhores condições para o processo como sendo: tempo de hidrólise ácida assistida por ultrassom de 10 minutos na frequência de 35 kHz com 100% de amplitude, temperatura de 30 °C utilizando 300 mg de amostra e 3 mL de H₂SO₄ a 72% e posterior autoclavagem a 121 °C por 60 minutos.

Embora o tempo de hidrólise em autoclave não tenha sido reduzido, foi possível obter maior rendimento de açúcares fermentescíveis na condição otimizada do que o método de referência. Isto significa melhor conversão da palha de milho em produtos de valor agregado.

Os experimentos concisos de avaliação de concentração ácida mostraram que é necessário utilizar condições reacionais severas para compensar o reduzido tempo de hidrólise.

Ao final das otimizações, a lignina obtida através do método alternativo e convencional foram coletadas para a caracterização de grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Percebeu-se características estruturais muito semelhantes entre os dois resíduos, concluindo que o US possibilitou a obtenção de lignina em padrão equivalente ao NREL, mesmo em tempo de hidrólise reduzido.

Através da análise por microscopia eletrônica de varredura (SEM) foi possível comparar as morfologias da palha de milho *in natura*, livre de extrativos e da lignina obtida pelo método do NREL. Concluiu-se que a remoção de extrativos da palha tem relevante importância para o processo, devido a retirada de diversas partículas superficiais que prejudicam as demais análises. Já no resíduo ácido insolúvel observou-se a rede porosa de lignina que restou da solubilização dos carboidratos pelo ácido sulfúrico concentrado.

Portanto, através de um método alternativo, este trabalho possibilitou a valorização de um resíduo industrial que é a lignina proveniente da palha de milho. Na forma sólida, a lignina pode ser empregada em compósitos com polímeros para construção de produtos leves, com resistência física e microbiológica. Quando despolimerizada, os monômeros da lignina podem ser utilizados na indústria de fármacos, cosméticos, biocombustíveis e alimentícia devido suas características antioxidantes e de termoestabilidade.

Além da lignina, elevados rendimentos de carboidratos foram obtidos da hidrólise da biomassa lignocelulósica. Recebem destaque industrial devido ao uso bem estabelecido na fabricação de produtos da química fina e biocombustíveis. Cabe evidenciar que nesta última aplicação não é necessário submeter os carboidratos à hidrólise enzimática, visto que já se encontram na forma de açúcares fermentescíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL DAIEM, M. M. *et al.* Energetic, economic, and environmental perspectives of power generation from residual biomass in Saudi Arabia. **Alexandria Engineering Journal**, 61, n. 5, p. 3351-3364, 2022.

ANSARI, K. B. *et al.* Recent developments in investigating reaction chemistry and transport effects in biomass fast pyrolysis: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 150, 2021.

BHUSHAN, S. *et al.* Functionalization of wool fabric using lignin biomolecules extracted from groundnut shells. **Int J Biol Macromol**, 142, p. 559-563, Jan 1 2020.

BIZZI, C. A. *et al.* Furfural production from lignocellulosic biomass by ultrasound-assisted acid hydrolysis. **Ultrason Sonochem**, 51, p. 332-339, Mar 2019.

BRODEUR, G. *et al.* Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Res**, 2011, p. 787532, 2011.

BUNDHOO, Z. M. A. *et al.* Ultrasound-assisted biological conversion of biomass and waste materials to biofuels: A review. **Ultrason Sonochem**, 40, n. Pt A, p. 298-313, Jan 2018.

BUSSEMAKER, M. J. *et al.* Effect of Ultrasound on Lignocellulosic Biomass as a Pretreatment for Biorefinery and Biofuel Applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 52, n. 10, p. 3563-3580, 2013.

CAPELO-MARTÍNEZ, J.-L. **Ultrasound in Chemistry Analytical Applications**. Wiley-VCH Verlag, 2009.

CHEMAT, F. *et al.* Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrason Sonochem**, 34, p. 540-560, Jan 2017.

CHERUBINI, F. *et al.* CO₂ emissions from biomass combustion for bioenergy: atmospheric decay and contribution to global warming. **GCB Bioenergy**, 3, n. 5, p. 413-426, 2011.

CHERUBINI, F. *et al.* Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 5, n. 5, p. 548-561, 2011.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Portal de Informações Agropecuárias. Produção Agrícola - Safra 2019/2020 - Estimativa de Evolução de Grãos**. Disponível em: <https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/safra-estimativa-de-evolucao-graos.html>. Acesso em: 25 março 2022.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Monitoramento agrícola. Acomp. safra bras. grãos, v. 9 Safra 2017/18 - Nono levantamento. p. 178, 2018.

DEVADASU, S. *et al.* Intensification of delignification of *Tectona grandis* saw dust as sustainable biomass using acoustic cavitation devices. **Ultrason Sonochem**, 63, p. 104914, May 2020.

DONATE, P. M. Síntese ambientalmente correta a partir de biomassa. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, 6, 2014.

FLORES, E. M. M. *et al.* Ultrasound-assisted biomass valorization to industrial interesting products: state-of-the-art, perspectives and challenges. **Ultrason Sonochem**, 72, p. 105455, Apr 2021.

GAO PEIJI *et al.* Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. **Enzyme and Microbial Technology**, 20, p. 581-584, 1997.

GU, Y. *et al.* Comprehensive investigation of multiples factors in sulfuric acid pretreatment on the enzymatic hydrolysis of waste straw cellulose. **Bioresour Technol**, 340, p. 125740, Nov 2021.

HAMES, B. *et al.* Determination of Protein content in Biomass. NREL Laboratory Analytical Procedure. ENERGY. Golden 2008.

HU, F. *et al.* Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. **BioEnergy Research**, 5, n. 4, p. 1043-1066, 2012.

HUBER, G. W. **Breaking the Chemical and Engineering Barriers to Lignocellulosic Biofuels: Next Generation Hydrocarbon Biorefineries**. Washington D.C.: National Science Foundation. Chemical, Bioengineering, Environmental, and Transport Systems Division, 2008. 180 p.

JEDRZEJCZYK, M. A. *et al.* Lignin-Based Additives for Improved Thermo-Oxidative Stability of Biolubricants. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 9, n. 37, p. 12548-12559, 2021.

JIN, C. *et al.* Corn stover valorization by one-step formic acid fractionation and formylation for 5-hydroxymethylfurfural and high guaiacyl lignin production. **Bioresour Technol**, 299, p. 122586, Mar 2020.

JOHNSTON, P. A. *et al.* A lignin-first strategy to recover hydroxycinnamic acids and improve cellulosic ethanol production from corn stover. **Biomass and Bioenergy**, 138, 2020.

KAPARAJU, P. *et al.* Characterization of lignin during oxidative and hydrothermal pretreatment processes of wheat straw and corn stover. **Bioresour Technol**, 101, n. 9, p. 3175-3181, May 2010.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2 ed. EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2019. 586 p.

KUMAR, B. *et al.* Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. **Fuel Processing Technology**, 199, 2020.

LAUBERTE, L. *et al.* Lignin – Derived antioxidants as value-added products obtained under cavitation treatments of the wheat straw processing for sugar production. **Journal of Cleaner Production**, 303, 2021.

LI, B. *et al.* Fractionation and oxypropylation of corn-stover lignin for the production of biobased rigid polyurethane foam. **Industrial Crops and Products**, 143, 2020.

LIU, X. *et al.* Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corn cob hydrolysate by HPLC-PDA-ELSD. **Carbohydr Res**, 353, p. 111-114, May 15 2012.

LUO, J. *et al.* Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, 41, p. 56-93, 2014.

MANO, E. B. *et al.* **A natureza e os polímeros**. Editora Blucher, 2013.

MASON, T. J. *et al.* **Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing**. Wiley-VCH Verlag, 2002.

MERONI, D. *et al.* Sonoprocessing: From Concepts to Large-Scale Reactors. **Chem Rev**, 122, n. 3, p. 3219-3258, Feb 9 2022.

MOHAMMADABADI, S. I. *et al.* Lignin extraction from barley straw using ultrasound-assisted treatment method for a lignin-based biocomposite preparation with

remarkable adsorption capacity for heavy metal. **Int J Biol Macromol**, 164, p. 1133-1148, Dec 1 2020.

MOHAPATRA, S. *et al.* Physicochemical characterization, modelling and optimization of ultrasono-assisted acid pretreatment of two Pennisetum sp. using Taguchi and artificial neural networking for enhanced delignification. **J Environ Manage**, 187, p. 537-549, Feb 1 2017.

NARRON, R. H. *et al.* Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process. **Curr Opin Biotechnol**, 38, p. 39-46, Apr 2016.

OBYDENKOVA, S. V. *et al.* Environmental economics of lignin derived transport fuels. **Bioresour Technol**, 243, p. 589-599, Nov 2017.

ORIEZ, V. *et al.* Lignocellulosic Biomass Fractionation by Mineral Acids and Resulting Extract Purification Processes: Conditions, Yields, and Purities. **Molecules**, 24, n. 23, Nov 23 2019.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. Cengage Learning, 716 p.

ROMERO, I. *et al.* Ethanol production from rape straw by a two-stage pretreatment under mild conditions. **Bioprocess Biosyst Eng**, 38, n. 8, p. 1469-1478, Aug 2015.

RUNCANG SUN *et al.* Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. **Industrial Crops and Products**, 15, p. 179–188, 2002.

SANTOS, D. *et al.* Ultrasound-Assisted Demineralization Process of Sugarcane Straw and Its Influence on the Further Biomass Conversion. **Sustainability**, 14, n. 1, 2022.

SANTOS, M. S. R. d. Estudo de pré-tratamento de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G. **UFAL**, 2014.

SIPPONEN, M. H. *et al.* Isolation of structurally distinct lignin-carbohydrate fractions from maize stem by sequential alkaline extractions and endoglucanase treatment. **Bioresour Technol**, 133, p. 522-528, Apr 2013.

SIQUEIRA, J. G. W. *et al.* Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, 132, 2020.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. NREL Laboratory analytical procedure. ENERGY. Golden 2008.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. NREL Laboratory Analytical Procedure. ENERGY. Golden 2008.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Extractives in Biomass. NREL Laboratory analytical procedure. ENERGY. Golden 2005.

SON, Y. *et al.* Comparison of calorimetric energy and cavitation energy for the removal of bisphenol-A: The effects of frequency and liquid height. **Chemical Engineering Journal**, 183, p. 39-45, 2012.

SOTO, M. L. *et al.* Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. **Journal of Food Engineering**, 105, n. 1, p. 1-27, 2011.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, 2004.

SUN, D. *et al.* Effects of hydrothermal pretreatment on the dissolution and structural evolution of hemicelluloses and lignin: A review. **Carbohydr Polym**, 281, p. 119050, Apr 1 2022.

SUSLICK, K. S. The Chemical Effects of Ultrasound. **SCIENTIFIC AMERICAN**, 1989.

WANG, H. *et al.* Protein Nitrogen Determination by Kjeldahl Digestion and Ion Chromatography. **J Pharm Sci**, 105, n. 6, p. 1851-1857, Jun 2016.

WU, Y. *et al.* Organic solvent isolation and structural characterization of willow lignin. **BioResources**, 13 (4), p. 7957-7968, 2018.

XIAO B. *et al.* Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, 74, p. 307-319, 2001.

XU, F. *et al.* Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. **Industrial Crops and Products**, 23, n. 2, p. 180-193, 2006.

YANG, M. *et al.* Treatment of different parts of corn stover for high yield and lower polydispersity lignin extraction with high-boiling alkaline solvent. **Bioresour Technol**, 249, p. 737-743, Feb 2018.

YOO, C. G. *et al.* The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. **Bioresour Technol**, 301, p. 122784, Apr 2020.

ZENG, J. *et al.* Isolation and structural characterization of sugarcane bagasse lignin after dilute phosphoric acid plus steam explosion pretreatment and its effect on cellulose hydrolysis. **Bioresour Technol**, 154, p. 274-281, Feb 2014.

ZHANG, M. *et al.* Fractionating lignocellulose by formic acid: Characterization of major components. **Biomass and Bioenergy**, 34, n. 4, p. 525-532, 2010.

ZHANG, P. *et al.* Fractionation of corn stover into cellulose, hemicellulose and lignin using a series of ionic liquids. **Industrial Crops and Products**, 76, p. 688-696, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* Influence of corn straw on distribution and migration of nitrogen and heavy metals during microwave-assisted pyrolysis of municipal sewage sludge. **Sci Total Environ**, 815, p. 152303, Apr 1 2022.

ZHU, M. Q. *et al.* Effect of structural changes of lignin during the autohydrolysis and organosolv pretreatment on *Eucommia ulmoides* Oliver for an effective enzymatic hydrolysis. **Bioresour Technol**, 185, p. 378-385, Jun 2015.

ZOGLAMI, A. *et al.* Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. **Front Chem**, 7, p. 874, 2019.