

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE CERA DE CANA-DE-AÇÚCAR A PARTIR DE  
SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA SUCRO-ALCOOLEIRA:  
EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

**Thais Maria Ferreira de Souza Vieira**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de  
Engenharia para a obtenção do título de Doutor em  
Tecnologia de Alimentos

Campinas - SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

V673o Vieira, Thais Maria Ferreira de Souza  
Obtenção de cera de cana-de-açúcar a partir de subproduto da indústria sucro-alcooleira: extração, purificação e caracterização / Thais Maria Ferreira de Souza Vieira.-- Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Daniel Barrera-Arellano  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Ceras. 2.Purificação. 3.Ésteres. 4.Álcoois graxos.  
5.Propriedades térmicas. I.Barrera-Arellano, Daniel.  
II.Universidade estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano (Orientador)

---

Dra. Caroline Joy Steel

---

Prof. Dra. Marisa A. B. Regitano-D´Arce

---

Dra. Nara Lúcia Facioli

---

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

---

Prof. Dra. Lireny A. G. Gonçalves

---

Prof. Dra. Jane Mara Block

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador, Dr. Daniel Barrera-Arellano pelo suporte técnico e pelos ensinamentos seguros;

À Dra. Lireny A. G. Gonçalves, Dr. Renato Grimaldi e Rosana C. Nogueira pelas sugestões, pelo inestimável auxílio na parte experimental e pela amizade;

Aos professores Dra. Marisa A. B. Regitano-D´Arce e Dr. Gil Eduardo Serra, à Dra. Caroline Joy Steel e Dra. Nara Lúcia Facioli pelas correções e sugestões que permitiram o aprimoramento deste trabalho e pela participação na banca;

Aos técnicos, estagiários e colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras-DTA-FEA, em especial à Camila, Sylaine, Maria, Juliana, Marinalda e Neiva, pela convivência agradável e incentivo. À Victória, pelas informações e colaboração nas análises de DSC e pela amizade;

À Dra. Regina Lago e Dra. Coralie Roussel-Philippe pelo incentivo, apoio e amizade;

Ao Dr. Jean Graille, Dr. Michel Pina e Dr. Pierre Villeneuve pela assistência durante a realização do estágio no CIRAD-AMIS. Agradecimento especial ao técnico Bruno Barea, pelo suporte na parte experimental;

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro para a realização do estágio no CIRAD-AMIS, em Montpellier, França;

Aos familiares e amigos pelo apoio e carinho, especialmente ao meu marido, Sérgio;

A todas as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

---

|   |          |
|---|----------|
| LISTA DE TABELAS .....  | VIII     |
| LISTA DE FIGURAS .....  | XI       |
| RESUMO.....   | XV       |
| SUMMARY.....  | XVI      |
| <b>1. Introdução.....</b>   | <b>1</b> |
| <b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>                              | <b>3</b> |
| 2.1. Ceras .....  | 3        |
| 2.1.1. Características gerais.....                                | 3        |
| 2.1.2. Principais componentes presentes em ceras naturais .....   | 7        |
| 2.1.2.1. Ésteres de cera.....                                     | 7        |
| 2.1.2.2. Álcoois graxos .....                                     | 7        |
| 2.1.2.3. Ácidos graxos .....                                      | 8        |
| 2.1.2.4. Esteróis e ésteres de esterois .....                     | 8        |
| 2.1.2.5. Hidrocarbonetos.....                                     | 10       |
| 2.1.3. Ocorrência e separação de ceras de diferentes fontes ..... | 10       |
| 2.1.3.1. Ceras presentes em óleos vegetais .....                  | 10       |
| 2.1.3.2. Obtenção de ceras comerciais naturais.....               | 13       |
| 2.1.4. Análise de ceras.....                                      | 14       |
| 2.1.4.1. Índices analíticos .....                                 | 14       |
| 2.1.4.2. Composição de ceras .....                                | 16       |
| 2.1.4.3. Propriedades térmicas de ceras .....                     | 22       |
| 2.2. Cana-de-açúcar .....   | 23       |
| 2.2.1. Cera de cana-de-açúcar.....                                | 25       |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.1.1. Extração de cera de cana-de-açúcar .....                           | 26        |
| 2.2.1.2. Purificação de cera de cana-de-açúcar .....                        | 29        |
| 2.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos .....                          | 32        |
| 2.4. Considerações sobre planejamento experimental .....                    | 33        |
| <b>3. Material, Métodos e Procedimento Experimental .....</b>               | <b>37</b> |
| 3.1. Material .....   | 37        |
| 3.1.1. Matéria-prima .....  | 37        |
| 3.1.2. Vidrarias, reagentes e equipamentos .....                            | 38        |
| 3.2. Métodos .....  | 38        |
| 3.2.1. Caracterização das tortas de filtro .....                            | 38        |
| 3.2.2. Caracterização física e química das ceras .....                      | 38        |
| 3.2.3. Avaliação do comportamento térmico das ceras .....                   | 42        |
| 3.2.4. Composição em ácidos e álcoois graxos .....                          | 42        |
| 3.2.5. Identificação e quantificação de esteróis .....                      | 47        |
| 3.2.6. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) ..... | 48        |
| 3.3. Procedimento experimental .....  | 50        |
| 3.3.1. Seleção do solvente de extração .....                                | 50        |
| 3.3.2. Extração e purificação da cera de cana-de-açúcar .....               | 51        |
| 3.3.3. Caracterização das ceras obtidas .....                               | 51        |
| 3.3.4. Otimização da extração de cera de cana-de-açúcar .....               | 52        |
| 3.3.5. Estudo do processo de purificação .....                              | 55        |
| <b>4. Resultados e Discussão .....</b>                                      | <b>59</b> |
| 4.1. Caracterização da torta de filtro .....                                | 59        |
| 4.2. Seleção do solvente de extração de cera .....                          | 59        |
| 4.3. Extração e purificação das ceras .....                                 | 63        |
| 4.4. Caracterização das ceras obtidas .....                                 | 64        |
| 4.5. Composição em álcoois e ácidos graxos .....                            | 66        |
| 4.5.1. Composição em álcoois graxos .....                                   | 67        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5.2. Composição em ácidos graxos .....                  | 74         |
| 4.6. Composição em esteróis .....                         | 79         |
| 4.7. Avaliação do comportamento térmico das ceras .....   | 83         |
| 4.8. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) ..... | 93         |
| 4.9. Otimização da extração .....                         | 96         |
| 4.10. Estudo do processo de purificação .....             | 104        |
| <b>5. Conclusões</b> .....                                | <b>125</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                   | <b>127</b> |

## LISTA DE TABELAS

|  | pág |
|--|-----|
| Tabela 1. Componentes encontrados nas ceras de superfície de plantas .....   | 5   |
| Tabela 2. Características de diferentes ceras .....  | 15  |
| Tabela 3. Composição típica de torta de filtro de cana-de-açúcar.....  | 24  |
| Tabela 4. Gradiente de eluição para separação de HPA.....  | 49  |
| Tabela 5. Faixas de estudo das variáveis independentes em análise no processo de extração de cera de cana-de-açúcar.....   | 53  |
| Tabela 6. Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo 2 <sup>3</sup> (valores codificados) aplicado à otimização do processo de extração de cera de cana-de-açúcar com n-hexano..... | 54  |
| Tabela 7. Faixas de estudo das variáveis independentes em análise no estudo do processo de purificação de cera de cana-de-açúcar .....   | 57  |
| Tabela 8. Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo 2 <sup>2</sup> (valores codificados) aplicado no estudo do processo de purificação da cera de cana-de-açúcar .....             | 58  |
| Tabela 9. Umidade e teor de lipídios (base seca) de tortas de filtro de cana-de-açúcar ...   | 59  |
| Tabela 10. Rendimento (%) da extração de tortas de filtro de cana-de-açúcar com diferentes solventes.....  | 60  |
| Tabela 11. Teor de cera precipitada (%) nas de tortas de filtro de cana-de-açúcar extraídas com diferentes solventes.....  | 61  |
| Tabela 12. Teor de clorofila (mg.kg <sup>-1</sup> ) em ceras de cana-de-açúcar .....   | 63  |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 13. Características de ceras de cana-de-açúcar e ceras comerciais de abelha e carnaúba.....   | 65  |
| Tabela 14. Composição em álcoois graxos de ceras de cana-de-açúcar e ceras comerciais de abelha e carnaúba .....   | 69  |
| Tabela 15. Teor de octacosanol em amostras de cera de cana-de-açúcar.....  | 73  |
| Tabela 16. Composição em ácidos graxos esterificados de ceras de cana-de-açúcar e ceras comerciais.....  | 75  |
| Tabela 17. Composição (% de área) e concentração de esteróis totais em cera bruta de cana orgânica. ....   | 82  |
| Tabela 18. Parâmetros obtidos na fusão das ceras analisadas por DSC .....  | 88  |
| Tabela 19. Parâmetros obtidos na cristalização das ceras analisadas por DSC .....  | 88  |
| Tabela 20. Teor de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de cera bruta de cana queimada ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) .....   | 94  |
| Tabela 21. Rendimentos relativos (R %) obtidos no estudo de otimização do processo de extração de cera de cana-de-açúcar (planejamento experimental fatorial completo - $2^3$ )..... | 97  |
| Tabela 22. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento relativo da extração (R %) de cera de tortas de filtro de cana-de-açúcar.....                       | 98  |
| Tabela 23. Análise de variância (ANOVA) para o rendimento relativo (R%) do processo de extração de cera de cana-de-açúcar. ....  | 99  |
| Tabela 24. Respostas obtidas nos ensaios do estudo do processo de purificação da cera bruta de cana-de-açúcar (planejamento experimental fatorial completo - $2^2$ )                 | 106 |
| Tabela 25. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento (%) do processo de purificação da cera de cana-de-açúcar.....                                       | 107 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 26. Análise de variância (ANOVA) para o rendimento (%) do processo de purificação da cera de cana-de-açúcar .....   | 108 |
| Tabela 27. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a <i>Tonset</i> (°C) de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar ..... | 110 |
| Tabela 28. Análise de variância (ANOVA) para a <i>Tonset</i> (°C) de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar .....                        | 111 |
| Tabela 29. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a entalpia de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar                 | 114 |
| Tabela 30. Análise de variância (ANOVA) para a entalpia de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar .....                                  | 114 |
| Tabela 31. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a altura do pico de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar .....     | 115 |
| Tabela 32. Análise de variância (ANOVA) para a altura do pico de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar. ....                            | 116 |

## LISTA DE FIGURAS

|  | pág |
|--|-----|
| Figura 1. Estrutura básica de um éster de cera.....  | 7   |
| Figura 2. Fitosteróis de maior ocorrência.....   | 9   |
| Figura 3. Esquema de derivatização de cera com reagente de Grignard.....   | 44  |
| Figura 4. Estrutura química da fase estacionária TCP (Tetracloroftalimidopropil).....                                    | 48  |
| Figura 5. Fluxograma do processo de purificação cera de cana-de-açúcar com hexano.....                                   | 56  |
| Figura 7. Comparação entre a contribuição de álcoois graxos de cadeia longa na composição de ceras.....                  | 70  |
| Figura 9. Cromatograma dos álcoois graxos de cera purificada de cana orgânica.....                                       | 71  |
| Figura 10. Cromatograma dos álcoois graxos de cera de abelha.....  | 72  |
| Figura 11. Curva de calibração utilizada para a quantificação do octacosanol nas amostras de cera de cana-de-açúcar..... | 73  |
| Figura 12. Comparação entre a contribuição de ácidos graxos de cadeia média e longa na composição de ceras.....          | 76  |
| Figura 13. Cromatograma dos álcoois graxos terciários em cera bruta de cana orgânica.....                                | 77  |
| Figura 14. Cromatograma dos álcoois graxos terciários em cera purificada de cana orgânica.....                           | 78  |
| Figura 15. Cromatograma dos álcoois graxos terciários em cera de carnaúba.....   | 78  |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 16. Acompanhamento da derivatização de éster de esterol com reagente de Grignard.....  | 79  |
| Figura 17. Acompanhamento da derivatização de cera bruta de cana orgânica com reagente de Grignard.....   | 80  |
| Figura 18. Cromatograma dos esteróis em cera bruta de cana orgânica.....  | 81  |
| Figura 19. Termogramas de fusão de cera de abelha, cera bruta de cana orgânica e de cera bruta de cana queimada.....                              | 83  |
| Figura 20. Termograma de cristalização de cera de abelha.....   | 85  |
| Figura 21. Termograma de cristalização de cera bruta de cana orgânica.....  | 85  |
| Figura 22. Termograma de cristalização de cera bruta de cana queimada.....  | 86  |
| Figura 24. Curva de cristalização de cera de carnaúba.....  | 89  |
| Figura 25. Curva de cristalização de cera purificada de cana orgânica.....  | 90  |
| Figura 26. Curva de cristalização de cera purificada de cana queimada.....  | 90  |
| Figura 27. Teor de sólidos (%) de amostras de cera de cana-de-açúcar e ceras comerciais de abelha e carnaúba.....                                 | 92  |
| Figura 28. Curva de calibração utilizada para quantificação de fluoranteno.....   | 94  |
| Figura 29. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostra de cera bruta de cana queimada.....  | 95  |
| Figura 30. Efeito do tempo e da relação solvente:matéria-prima sobre o rendimento relativo da extração de cera de cana-de-açúcar.....             | 100 |
| Figura 31. Efeito da relação solvente:matéria-prima e tamanho de partícula sobre o rendimento relativo da extração de cera de cana-de-açúcar..... | 101 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 32. Efeito do tamanho de partícula e do tempo sobre o rendimento relativo da extração de cera de cana-de-açúcar.....   | 102 |
| Figura 33. Efeito da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre o rendimento em fração sólida (%) durante o processo de purificação de cera de cana-de-açúcar.....      | 109 |
| Figura 34. Efeito da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre a Tonset (°C) da fração sólida obtida no processo de purificação da cera de cana-de-açúcar.....         | 112 |
| Figura 35. Efeito da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre a entalpia de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar.....       | 117 |
| Figura 36. Efeito da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre a altura do pico de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar..... | 118 |
| Figura 37. Termogramas de fusão de frações de cera de cana-de-açúcar.....   | 119 |
| Figura 38. Termogramas de cristalização de frações de cera de cana-de-açúcar.....   | 120 |

## **ABREVIATÖES UTILIZADAS**

CCD = cromatografia em camada delgada

CG = cromatografia gasosa

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

DSC = calorimetria diferencial de varredura

FA = ácido graxo

FAL = álcool graxo

FAL-3 = álcool graxo terciário

FID = detector de ionização de chama

HC = hidrocarboneto

HPA = hidrocarboneto policíclico aromático

IS = padrão interno

SE = éster de esterol

ST = esterol

TAG = triglicerídio

UV = ultravioleta

WE = éster de cera

## Resumo

As ceras possuem propriedades importantes para o uso nos setores alimentício, cosmético, de limpeza e polimento. O conhecimento de suas características é essencial para sua aplicação. A cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) extraída da torta de filtro, um resíduo da indústria sucro-alcooleira, pode ser uma alternativa às ceras de carnaúba, abelha e ceras sintéticas. Considerando a larga disponibilidade de torta de filtro nos países produtores de cana, o potencial de produção desta cera é bastante grande. Neste trabalho foram estudadas as etapas de extração e fracionamento de cera de cana-de-açúcar com solventes. Os rendimentos da extração de dois tipos de tortas filtro com hexano foram de 4,32 e 7,11% em cera bruta. Os índices analíticos apresentados pelas ceras purificadas de cana foram comparáveis aos das ceras comerciais de abelha e carnaúba. As ceras purificadas apresentaram alta pureza quanto à composição em classes de lipídios, observada pelas análises de DSC, cujas curvas de fusão e cristalização mostraram picos únicos e estreitos. As propriedades térmicas dessas ceras (temperatura de pico de fusão entre 80,9 e 81,7°C) aproximaram-se das da cera de carnaúba (picos de fusão a 82,0 e 88,1°C). Os ácidos graxos das ceras de cana foram principalmente os saturados de cadeia normal e longa, com uma predominância do ácido palmítico (C16:0) e octacosanóico (C28:0). As amostras de cera de cana apresentaram álcoois graxos saturados de 24 a 34 carbonos. O principal álcool graxo foi o octacosanol (C<sub>28</sub>H<sub>57</sub>OH), cujos teores variaram de 118,57 a 224,89 mg.g<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** cera, torta de filtro de cana-de-açúcar, extração, purificação, ésteres, álcoois graxos, propriedades térmicas, DSC

## Summary

Waxes have important specific properties for food and cosmetic uses, and for cleaning and polishing applications. The knowledge of the characteristics of waxes is essential for their application. Wax recovered from sugarcane (*Saccharum officinarum*) filter cake, a by-product of the sugar and alcohol industry, represents a potential alternative to carnauba, beeswax, and synthetic waxes, considering the enormous resources of raw material in sugarcane growing countries. Crude wax solvent extraction and fractionation were studied in this project. Two types of filter cake extracted with hexane yielded 4.32 and 7.11% crude sugarcane wax, respectively. Purified sugarcane waxes presented analytical indexes similar to those of commercial bee and carnauba waxes. Purified sugarcane wax appeared to be homogeneous in terms of composition, containing few lipid classes, as indicated by DSC analysis. Single narrow peaks were observed during melting and crystallization of these samples. The thermal properties of purified sugarcane wax (melting peak between 80.9 and 81.7°C) closely resembled those of carnauba wax (melting peaks at 82.0 and 88.1°C). Fatty acids of sugarcane waxes were mainly normal and long-chain saturated compounds, predominantly C16:0 (palmitic) and C28:0 (octacosanoic). Long-chain saturated fatty alcohols, ranging from C24 to C34, were observed in sugarcane wax samples, with a large predominance of octacosanol (C<sub>28</sub>H<sub>57</sub>OH). Octacosanol content ranged from 118,57 to 224,89 mg.g<sup>-1</sup>.

**Key words:** sugarcane wax, sugarcane filter cake, extraction, purification, esters, fatty alcohols, thermal properties, DSC

## 1. Introdução

O termo cera é normalmente usado como referência a uma mistura de compostos apolares de cadeia longa, podendo constituir uma ampla gama de diferentes classes químicas, incluindo hidrocarbonetos, ésteres de cera, ésteres de esteróis, cetonas, aldeídos, álcoois graxos, ácidos graxos e esteróis (WARTH, 1947; LI & PARISH, 1998; O'KEEFE, 1998; PERKINS, 1993).

As ceras podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em naturais ou sintéticas. Dentre as naturais, podem ser classificadas em vegetais ou animais (LI & PARISH, 1998). As ceras possuem propriedades específicas importantes para o uso alimentício, cosmético e no setor de limpeza e polimento.

A cera de cana-de-açúcar extraída da torta de filtro, resíduo da filtração do caldo de cana, pode ser uma alternativa para a cera de carnaúba, candelila, abelha e ceras sintéticas. A cera de cana forma-se em depósitos, principalmente perto dos nós e das bainhas foliares, e tem a função de proteção contra a perda de água por evaporação. Quando a cana é moída, a cera se apresenta como impureza em suspensão no caldo, sendo posteriormente concentrada na chamada torta (ADAMENAS, 1982).

Atualmente não há produção industrial de cera de cana-de-açúcar no Brasil e a torta de filtro é um resíduo desperdiçado. O Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar e um potencial fornecedor de ceras obtidas a partir desse subproduto da indústria sucro-alcooleira. Os parâmetros de produção de cera de cana são pouco estudados. Por se tratar de um produto com alto ponto de fusão,

que se solidifica à temperatura ambiente, os processos de extração e refino devem ser realizados sob condições específicas.

O presente trabalho teve por objetivo principal o aproveitamento da torta de filtro de cana-de-açúcar para a obtenção de cera, envolvendo os seguintes objetivos específicos:

- selecionar o solvente para extração de cera de cana-de-açúcar de torta de filtro.
- estabelecer um processo de purificação da cera bruta de cana-de-açúcar.
- analisar as ceras de cana-de-açúcar obtidas quanto às suas propriedades físico-químicas, comparando-as a ceras comerciais de abelha e de carnaúba.

A extração de cera com solvente e sua posterior purificação são processos que apresentam condições que podem afetar o rendimento e qualidade da cera obtida. Por esse motivo, foram aplicadas técnicas de planejamento experimental e análise de superfície de resposta para o estudo de cada um desses processos.

As propriedades térmicas das ceras obtidas foram avaliadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC). A composição em ácidos e álcoois graxos, bem como a determinação do teor de esteróis e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas amostras de cera, foi realizada durante estágio no CIRAD-AMIS (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement – Amélioration de Méthodes pour l’Innovation Scientifique*), França.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Ceras**

#### **2.1.1. Características gerais**

O termo cera é normalmente usado como referência a uma mistura de compostos apolares de cadeia longa, encontrados na superfície de plantas e animais. Numa definição estrita, uma cera é o éster de um ácido graxo de cadeia longa com um álcool graxo de cadeia longa (O'KEEFE, 1998; LI & PARISH, 1998; PERKINS, 1993). Esta definição não seria adequada para englobar a ampla variedade de substâncias conhecidas como ceras (HAMILTON, 1995). Segundo DOMÍNGUES & HEREDIA (1998), a palavra cera (*wax*, em inglês) é derivada do termo anglo-saxão *weax*, utilizado para descrever o material proveniente dos favos de mel. Substâncias similares isoladas de plantas também eram chamadas de cera. Atualmente, o termo cera é usado na denominação de várias substâncias sólidas encontradas na natureza ou de componentes isolados desses produtos, cuja aparência ou propriedades são similares às de ceras naturais como a de abelha. Essa relação etimológica comprova que as similaridades entre diferentes ceras não são baseadas em sua composição, fonte, ou método de obtenção.

As ceras podem constituir uma ampla gama de diferentes classes de lipídios, incluindo ésteres de cera, esteróis e ésteres de esteróis, álcoois e ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, cetonas, aldeídos, bem como lipídios mais simples

como os triglicerídios (CHRISTIE, 1982; WARTH, 1947; Sayers, 1983<sup>1</sup>, citado por LI & PARISH, 1998).

As ceras podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em naturais ou sintéticas. Dentre as naturais, podem ser classificadas em vegetais ou animais. A cera de abelha (*Apis spp.*) e a lanolina são importantes ceras animais. Exemplos de ceras vegetais incluem a carnaúba (*Copernicia cerifera*), chamada “rainha das ceras”, ouricouri (*Syagrus coronata*, *Cocos coronata*, *Attalea excelsa*) e candelila (*Euphorbia cerifera*, *E. antisiphilitica*, *Pedilanthus pavenis*). Estas três ceras perfazem o maior volume de consumo mundial das ceras vegetais (COUPLAND & NICHOLS, 1997; LI & PARISH, 1998). No ano de 2001, a produção brasileira de cera de carnaúba, decorrente dos processos de exploração dos recursos naturais, foi de 2.883 toneladas (IBGE, 2003).

As ceras da superfície de plantas são lipídios funcionais, que exercem papel importante na preservação do balanço de água da planta através da redução da evaporação na superfície, servindo como uma barreira à passagem de água contida nas células. Também têm função de proteção contra danos causados por microorganismos, insetos e outros elementos. Tais ceras são sintetizadas nas camadas mais externas do tecido vegetal de folhas, bainhas foliares, caules e frutos, por células especializadas, e geralmente apresentam composição muito diferente em relação aos outros lipídios encontrados em tecidos internos e organelas celulares da mesma planta. A quantidade de cera produzida por uma planta depende das condições de crescimento e a sua composição é menos afetada por fatores ambientais (LI & PARISH, 1998; DOMÍNGUES & HEREDIA, 1998).

---

<sup>1</sup> SAYERS, R. Wax - An Introduction. European Wax Federation and Gentry Books. London, 1983.

Nas plantas, a síntese da cera inicia-se através de processos de redução e carboxilação de lipídios simples, os quais são convertidos em álcoois, ácidos e hidrocarbonetos de alto peso molecular. A composição da cera é característica de cada espécie (BENNET, 1956). Sesquiterpenos e alcanos, por exemplo, são os principais grupos de componentes na cera cuticular de batata (*Solanum tuberosum*) e a sua composição é dependente da idade e variedade da planta (SZAFRANEK et al., 1998). A Tabela 1 ilustra a diversidade de componentes que podem estar presentes na camada cuticular de plantas.

Tabela 1. Componentes encontrados nas ceras de superfície de plantas

| Componente                   | Estrutura  |                         |
|------------------------------|--|-------------------------|
| n-Alcanos                    | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$                                      | 21 a 35C – número ímpar |
| Alquil ésteres               | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$             | 34 a 62C – número par   |
| Ácidos graxos                | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$                                      | 16 a 32C – número par   |
| Álcoois graxos (primários)   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y\text{CH}_2\text{OH}$                             | 22 a 32C – número par   |
| Aldeídos                     | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y\text{CHO}$                                       | 22 a 32C – número par   |
| Cetonas                      | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$              | 23 a 33C – número ímpar |
| Álcoois graxos (secundários) | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CHOH}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$            | 23 a 33C – número ímpar |
| $\beta$ -Dicetonas           | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COCH}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$ | 27 a 33C – número ímpar |
| Triterpenóides               | Esteróis, $\alpha$ -amirina, $\beta$ -amirina, uvaol, lupeol, eritrodol      |                         |
| Ácidos triterpenóicos        | Ácido ursólico, ácido oleanóico etc  |                         |

Fonte: CHRISTIE, 2003

As ceras naturais dividem o mercado com ceras sintéticas derivadas do petróleo, mas a qualidade das ceras naturais ainda é considerada insuperável. Tais ceras, devido às suas propriedades ímpares, apresentam várias aplicações técnicas. São componentes de produtos para polimento, produtos para proteção de couro, lubrificantes, vernizes, tintas, proteção para papel, material de revestimento para alimentos e produtos farmacêuticos (CARNAÚBA, 2000; WANG et al., 2001).

Em vários países, o uso de ceras naturais em diferentes produtos é permitido por órgãos como o FDA (Food and Drug Administration) ou equivalentes (MATTHIES, 2001). No setor alimentício, além do uso como material de revestimento com função de proteção (queijos e frutas), as ceras são utilizadas na elaboração de emulsões e biofilmes (GREENER-DONHOWE & FENNEMA, 1993). Emulsões de cera são utilizadas para retardar a deterioração de algumas frutas cítricas, pois as ceras naturais são componentes adequados para emulsões alimentícias por serem inertes e por sua dispersibilidade. Emulsões do tipo cera em água podem ser mais estáveis que emulsões tipo óleo em água, devido ao alto peso específico da cera, como no caso da candelila (HERNADEZ & BAKER, 1991). A utilização de cera de carnaúba na elaboração de filmes protéicos promove uma melhoria nas propriedades de barreira ao vapor e à umidade, acompanhada por melhoria na propriedade de extensão dos filmes. O produto resultante é comestível e biodegradável (WELLER et al., 1998).

Além dessas aplicações, por apresentarem em sua composição álcoois graxos de cadeia longa, algumas ceras são utilizadas como matéria prima para a indústria farmacêutica. Ceras, como a de arroz, carnaúba, abelha, cana-de-açúcar e gérmen de trigo, apresentam álcoois graxos de 24 a 36 carbonos em sua composição. A mistura desses álcoois graxos de cadeia longa é chamada policosanol, e sua administração oral tem apresentado efeito hipocolesterolêmico em vários estudos (STUCHLIK & ZAK, 2002).

## 2.1.2. Principais componentes presentes em ceras naturais

Conforme já elucidado, as ceras podem constituir-se de uma ampla gama de diferentes classes químicas. Dentre elas destacam-se os ésteres de cera, álcoois graxos, ácidos graxos, ésteres de esteróis e esteróis livres, hidrocarbonetos e triglicerídios (LI & PARISH, 1998). A seguir são apresentadas algumas características dos principais componentes presentes em ceras naturais.

### 2.1.2.1. Ésteres de cera

Os ésteres de cera constituem o principal componente de grande parte das ceras naturais. São moléculas de álcoois alifáticos de cadeia longa esterificadas a ácidos graxos. Os ésteres de cera são fracamente solúveis em solventes orgânicos de constante dielétrica alta (etanol e acetona) e mais solúveis em clorofórmio, éter etílico e benzeno. A reação de hidrólise dos ésteres de cera é extremamente lenta, exigindo um grande excesso de uma base forte para catalisar a reação e conduzi-la ao final. A saponificação dos ésteres de alto peso molecular é complicada devido à baixa solubilidade dos ésteres não hidrolisados e dos álcoois e ácidos graxos derivados nas soluções alcoólicas básicas (LI & PARISH, 1998).

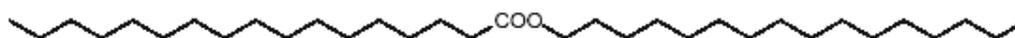


Figura 1. Estrutura básica de um éster de cera

### 2.1.2.2. Álcoois graxos

Os álcoois alifáticos ocorrem naturalmente na forma livre ou esterificada. Podem apresentar cadeias de vários comprimentos, geralmente saturadas, com funções alcoólicas primárias, secundárias ou, mais raramente, terciárias. Os álcoois de cadeia longa, denominados álcoois graxos, são relativamente solúveis

em solventes orgânicos de constante dielétrica de valor intermediário, como o éter etílico. As propriedades químicas dos álcoois graxos são as do grupo hidroxila, sendo que sua reatividade diminui com o aumento do comprimento da cadeia (SONNTAG, 1979). Álcoois graxos de 20 a 26 carbonos podem ser obtidos a partir da fração neutra do breu ("tall oil"). Outras fontes, como as ceras de arroz, carnaúba, abelha, cana-de-açúcar, gémem de trigo, apresentam álcoois de 24 a 36 carbonos.

### **2.1.2.3. Ácidos graxos**

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa, livres ou esterificados, são predominantes nas ceras sólidas naturais, tanto de origem animal quanto de origem vegetal (WARTH, 1947). O ácido palmítico (C16:0) é o predominante em ceras de abelha (NEGRI et al., 2000), mas cadeias mais longas, com 30 e 32 carbonos, ocorrem na cera de carnaúba (WARTH, 1947).

### **2.1.2.4. Esteróis e ésteres de esterol**

Os esteróis são álcoois cristalinos, neutros, de alto ponto de fusão. Podem se apresentar como esteróis livres e como ésteres de esteróis com ácidos graxos. Os esteróis apresentam o esqueleto 1,2-ciclopentanofenantreno, de 27 a 30 carbonos com uma hidroxila em C<sub>3</sub> e uma cadeia secundária, de pelo menos 7 carbonos em C<sub>7</sub> (LI & PARISH, 1998). A nomenclatura dos esteróis é baseada na estrutura dos anéis. Como o colesterol é um derivado da estrutura do colestano, (com o H em C<sub>5</sub> eliminado devido à dupla ligação), a nomenclatura padrão correta para o colesterol é 3 $\beta$ -colest-5-en-3-ol. A complexidade de padronizar a nomenclatura leva ao uso de nomes usuais para algumas estruturas comuns. Os ésteres de esterol são nomeados segundo a regra padrão para ésteres. Por exemplo, o éster de colesterol com ácido palmítico é o colesteril palmitato (O'KEEFE, 1998).

Os esteróis podem ser derivados de plantas (fitosteróis) ou de animais (zoosteróis). Os fitosteróis são caracterizados por um grupo alquil adicional no C<sub>24</sub> do núcleo do colesterol, com  $\alpha$ - ou  $\beta$ - quiralidade. Outra importante característica dos fitosteróis é a presença de uma dupla ligação adicional na cadeia secundária (LI & PARISH, 1998).

A composição em esteróis de plantas pode ser muito complexa. No milho (*Zea mays*), por exemplo, foram identificados pelo menos 65 esteróis diferentes. A composição em esteróis pode ser utilizada para identificar adulterações ou contaminações, pois esta proporciona uma "impressão digital" do material lipídico. Os esteróis mais importantes encontrados em óleos vegetais são:  $\beta$ - sitosterol, estigmasterol e campesterol (O'KEEFE, 1998; PATERSON & AMADO, 1997). Os óleos vegetais contêm entre 100 e 500 mg de esteróis por 100g (GUTFINGER & LETAN, 1974). A Figura 2 apresenta a estrutura dos esteróis mais abundantes na fração lipídica de vegetais.

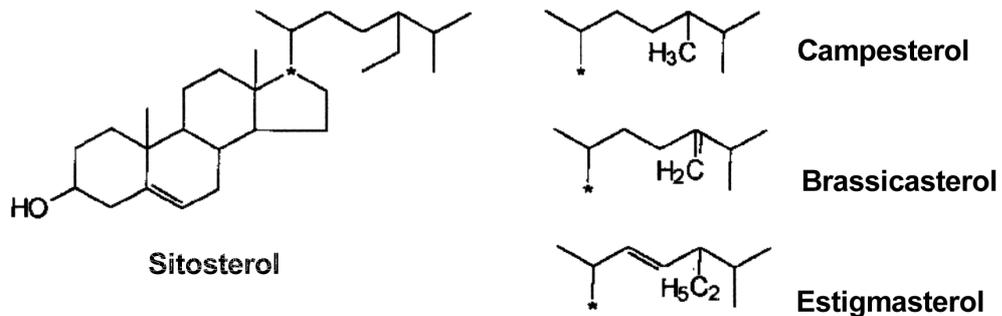


Figura 2. Fitosteróis de maior ocorrência

### **2.1.2.5. Hidrocarbonetos**

Os hidrocarbonetos presentes em ceras são os alcanos, hidrocarbonetos saturados, com cadeia entre 14 e 44 carbonos. Na cera de abelha, pequenas quantidades de hidrocarbonetos podem ser encontradas, principalmente o heptacosano ( $C_{27}H_{56}$ ) e o hentriacontano ( $C_{31}H_{64}$ ). Entretanto, os alcanos consistem no principal componente das ceras derivadas do petróleo. Os alcanos, sendo moléculas apolares, dissolvem-se apenas em solventes apolares como benzeno e em outros alcanos líquidos (gasolina, querosene etc) (WARTH, 1947).

### **2.1.3. Ocorrência e separação de ceras de diferentes fontes**

#### **2.1.3.1. Ceras presentes em óleos vegetais**

As ceras podem ser extraídas juntamente com os lipídios totais da amostra com hexano ou clorofórmio. Por esse motivo, existem muitos trabalhos na literatura científica referentes à presença de ceras em óleos normalmente comercializados. Tais referências fornecem indicações sobre métodos para a separação e determinação do teor de cera de diferentes fontes (ROSSEL & PRITCHARD, 1991).

O teor de cera em óleos depende não somente do tipo de matéria-prima utilizada, mas também da temperatura e tipo de solvente empregados na extração. As ceras presentes em óleos vegetais atribuem-lhes turbidez. Se um óleo refinado for resfriado ou armazenado durante um período prolongado a temperaturas inferiores às normais ambientes, qualquer cera presente irá se cristalizar, tornando o óleo turvo ou formando precipitados. Por esse motivo, muitas vezes é necessária a etapa de “winterização” do óleo, através do resfriamento para a cristalização das ceras e separação por centrifugação ou filtração. A quantificação

das ceras em óleos pode auxiliar na redução das perdas durante a neutralização (KOLODZIEJCZYK, 2000; SINGH et al., 1990).

Existem vários métodos descritos na literatura científica para a determinação do teor de cera em óleos. Normalmente envolvem a precipitação, recuperação e determinação do teor de cera através da cristalização a baixas temperaturas de um óleo ou mistura de óleo com solvente. A maioria desses métodos é baseada no trabalho de GRACIEN & AREVALO (1981). Neste método, o óleo é dissolvido em acetona e resfriado a  $-5^{\circ}\text{C}$ . A cera precipitada após 16 horas é separada por filtração, lavada, seca e pesada. Entretanto, esse método apresenta alguns inconvenientes: a presença de fosfolipídios pode inibir a precipitação e a eficiência da cristalização pode variar conforme a estrutura química apresentada por ceras de diferentes fontes (KOLODZIEJCZYK, 2000).

Outro método, proposto por MARIANI & FEDELI (1986), envolve a separação da fração contendo ceras por cromatografia em coluna e análise desta fração apolar por cromatografia gasosa. A adição de padrão interno na amostra original permite a quantificação das ceras presentes em um óleo.

O óleo de farelo de arroz pode conter níveis variáveis de ceras (2 - 5%), que foram separadas em cera dura e cera mole (pontos de fusão de  $79,5^{\circ}\text{C}$  e  $74^{\circ}\text{C}$ , respectivamente) por YOON & RHEE (1982). SINGH et al. (1990) determinaram o teor de cera em óleo de farelo de arroz com base na solubilidade do óleo e insolubilidade das ceras em metiletilcetona a  $4^{\circ}\text{C}$ . Uma amostra de 25g de óleo foi dissolvida em 25 mL de metiletilcetona, resfriada e centrifugada ( $2000 \times g$ , 1 hora) a  $4^{\circ}\text{C}$ . O teor de cera foi determinado gravimetricamente e variou de 3,5 a 4,8% nos diferentes óleos de farelo de arroz analisados.

A cera de arroz contém ésteres monoméricos, o que aproxima as propriedades da cera de arroz às da cera de carnaúba (BELAVADI & BHOWMICK, 1988). RAMAKRISHNA et al. (1987) relacionaram a concentração de cera do óleo de arroz, separada por centrifugação, à viscosidade do óleo. A viscosidade

aparente do óleo bruto de arroz aumentou com a concentração de cera (de 0,23% a 8,60%) e diminuiu com o aumento da temperatura.

O óleo de girassol também pode conter altos teores de ácidos graxos saturados de cadeia longa na forma de ésteres, que podem estar esterificados com esteróis ou com álcoois alifáticos de cadeia longa (JOHANSSON, 1979). O teor de cera em óleo de girassol pode ser determinado através do aquecimento da amostra a 130°C, seguido pelo resfriamento em gelo por 10-15 min. As ceras microcristalinas formadas são quantificadas pelo aumento na turbidez da amostra (BRIMBERG & WRETENSJO, 1979; MORRISON, 1982a; MORRISON, 1982b; MOULTON, 1988; TURKULOV et al., 1986). O isolamento da cera do óleo de girassol através de um sistema de coluna com sílica impregnada com nitrato de prata, eluído com éter de petróleo:clorofórmio 70:30, seguido da análise por cromatografia gasosa permitiu a determinação do teor de cera do óleo sem a necessidade da etapa de cristalização das ceras (HENON, 1986).

Além dos óleos de arroz e girassol, o óleo de canola refinado pode se tornar turvo durante o armazenamento devido à presença de ceras. A formação e composição do sedimento resultante da filtração de óleo de canola “winterizado” é assunto de recentes estudos (HU et al., 1993; PRZYBYLSKI et al., 1993; LIU et al., 1993). Esses trabalhos revelaram que o sedimento formado é uma mistura de triglicerídios saturados, ésteres de cera, ácidos graxos livres, esteróis e seus ésteres.

LIU et al. (1994) obtiveram cera de canola através da extração de torta de “winterização” de óleo de canola com clorofórmio. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com éter de petróleo a frio (2°C) para eliminação do óleo residual. A cera obtida foi utilizada em um estudo sobre a cinética de cristalização de cera em óleo de canola.

### 2.1.3.2. Obtenção de ceras comerciais naturais

**Cera de abelha:** As glândulas abdominais da abelha (*Apis spp.*) secretam a cera, que é utilizada na formação da colméia. A cera é recuperada como um subproduto durante a colheita do mel. Sua composição varia conforme a espécie de abelha e o tipo de tratamento que a colméia sofre. Geralmente, a cera de abelha contém uma alta proporção de ésteres de cera (35 a 80%), principalmente ésteres de 40 a 46 carbonos, cujos ácidos graxos são o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0). Alguns diésteres com mais de 64 carbonos podem estar presentes, além de ácidos graxos livres e uma pequena quantidade de hidrocarbonetos (CHRISTIE, 2003).

**Jojoba:** A planta de jojoba (*Simmondsia chinensis*) é cultivada nas regiões semi-áridas do México e Estados Unidos. As sementes de jojoba contêm cerca de 50% de lipídios, que consistem principalmente nos ácidos graxos 18:1 (6%), 20:1 (35%) e 22:1 (7%) ligados aos álcoois graxos 20:1 (22%), 22:1 (21%) e 24:1 (4%). Portanto, a cera de jojoba é um produto líquido, formado por ésteres com uma dupla ligação em cada componente. Cerca de 80% dos ésteres de cera correspondem às moléculas com 40 e 42 átomos de carbono (CHRISTIE, 2003; SAGUY et al., 1996).

**Carnaúba:** A cera de carnaúba (*Copernicia cerifera*) está presente nas folhas da planta, que podem atingir até 1 m de comprimento, e tem a função de proteção contra a desidratação e ataque de microrganismos. As folhas das árvores são cortadas manualmente e ficam estendidas no chão e expostas ao sol por vários dias. O processo de secagem revela a película de cera que recobre as folhas. As folhas são batidas para a retirada do pó, que é recolhido e fundido (CARNAUBA, 2000). A cera é formada principalmente por ésteres de cera, acompanhados por pequenas quantidades de ácidos e álcoois graxos livres, hidrocarbonetos e resinas. Os ésteres de cera são principalmente moléculas de 46 a 54 carbonos (CHRISTIE, 2003).

Outras ceras vegetais, como a “bayberry” ou “Japan wax” seriam descritas mais corretamente como gorduras, pois consistem principalmente de triglicerídios de alto ponto de fusão. A obtenção da cera de cana-de-açúcar é apresentada no item 2.2.1.

#### **2.1.4. Análise de ceras**

##### **2.1.4.1. Índices analíticos**

As ceras comerciais podem ser caracterizadas por uma série de propriedades como cor, índice de acidez, índice de saponificação, índice de éster, ponto de fusão e penetração (HAMILTON, 1995). Normalmente os métodos utilizados são adaptações daqueles aplicados à análise de óleos e gorduras.

Algumas propriedades físicas, como os pontos de fusão e de amolecimento, são parâmetros importantes para a definição da aplicação de ceras. O ponto de fusão pode ser determinado pelo método do capilar aberto. O ponto de amolecimento de uma cera refere-se à temperatura em que a amostra sólida começa a se tornar macia (LI & PARISH, 1998). A análise de ceras por calorimetria diferencial de varredura (DSC) também pode ser uma ferramenta útil para o conhecimento de suas propriedades térmicas, conforme apresentado no item 2.1.4.3.

Além das propriedades físicas, algumas propriedades químicas podem ser determinadas em amostras de cera. O índice de acidez indica a quantidade de ácidos graxos livres presentes em uma amostra e o índice de saponificação, a quantidade de ácidos graxos livres e esterificados. O tolueno é preferível como solvente de diluição de amostras de cera durante essas determinações, pois além de permitir uma boa solubilização da cera, é miscível com as soluções alcalinas alcoólicas utilizadas (LI & PARISH, 1998; WARTH, 1947). Através da relação entre esses índices pode-se estimar a razão entre ésteres e ácidos graxos livres

(HWANG et al., 2002). O índice de iodo expressa a quantidade de iodo que é absorvida pela cera, fornecendo uma indicação do grau de insaturação da amostra (LI & PARISH, 1998). A determinação do teor de matéria insaponificável também é importante na caracterização de ceras. A matéria insaponificável inclui todas as substâncias que permanecem insolúveis na água após a saponificação total da cera com álcali. Para tanto, deve ser usado um solvente adequado para a separação seletiva das fases. Geralmente, a matéria insaponificável é formada por álcoois graxos e hidrocarbonetos, se presentes. A maioria dos ésteres de cera contém entre 50 e 55% de álcoois graxos, livres e esterificados, enquanto que os triglicerídios apresentam no máximo 1 a 2% de álcoois, sendo que o glicerol liberado pela hidrólise dos triglicerídios é solúvel em água (WARTH, 1947). A Tabela 2 apresenta algumas propriedades de ceras comerciais de abelha, carnaúba e arroz.

Tabela 2. Características de diferentes ceras

| <b>Característica</b>                             | <b>carnaúba<sup>a,b</sup></b> | <b>arroz<sup>a</sup></b> | <b>abelha<sup>b,c,d</sup></b> |
|---|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Cor   | amarela, marrom ou verde      | marrom                   | branco, amarelo pálido        |
| ponto de fusão (°C)                               | 78,0-85,0                     | 74,0-79,5                | 62,0-65,0                     |
| índice de refração a 40°C                         | 1,4672-1,4720                 | 1,4630-1,4680            | 1,4380-1,4527                 |
| índice de acidez (mg KOH.g <sup>-1</sup> )        | 3,0-10,0                      | -                        | 17,0-36,0                     |
| índice de saponificação (mg KOH.g <sup>-1</sup> ) | 78,0-95,0                     | 84,3-94,8                | 80,0-149,0                    |
| índice de iodo (mg I.100g <sup>-1</sup> )         | 4,0-7,0                       | 20,7-20,1                | 5,0-15,0                      |
| matéria insaponificável (%)                       | 52,0-55,0                     | 53,8-66,5                | 51,9                          |

<sup>a</sup>SINGH et al. (1990), <sup>b</sup>GUNSTONE & PADLEY (1997), <sup>c</sup>FARAG et al. (1993), <sup>d</sup>BENNET (1956)

#### **2.1.4.2. Composição de ceras**

Em geral, ceras naturais são isoladas por extração com solvente e seus componentes separados por métodos cromatográficos (CHRISTIE, 1982; LI & PARISH, 1998). Entretanto, segundo HWANG et al., 2002 a separação das classes de lipídios presentes nas ceras não é uma tarefa fácil.

A separação das ceras em seus componentes foi primeiramente realizada por cromatografia em coluna. Através do aumento gradual da polaridade do solvente de eluição, pode ser possível obter hidrocarbonetos, ésteres de cera e de esterol, aldeídos e cetonas, triglicerídios, álcoois graxos, esteróis e ácidos graxos separadamente (CHRISTIE, 1982). O fracionamento e quantificação das classes de lipídios são feitos através do recolhimento das fases eluídas, evaporação do solvente e pesagem. Ceras duras, contudo, não se dissolvem facilmente em solventes em temperatura ambiente, havendo necessidade de aquecimento antes da aplicação na coluna. Neste caso, os solventes e a coluna também devem ser aquecidos, o que torna difícil a reprodução do método empregado, gerando dados inconsistentes (HWANG et al., 2002).

A maioria dos componentes das ceras pode ser parcial ou completamente separados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel eluídas com diferentes sistemas de solventes como tetracloreto de carbono, clorofórmio, hexano/éter etílico/ácido acético (LI & PARISH, 1998). Algumas ceras solidificam-se muito rapidamente e tendem a não eluir bem, independentemente do sistema de solvente utilizado. A quantificação por densitometria não se mostra adequada para análise de ceras, pois muitas vezes as placas obtidas não são uniformes (HWANG et al., 2002). Em um estudo sobre métodos de separação de álcoois graxos de diferentes fontes vegetais, KAWANISHI et al. (1991) utilizaram somente a fração solúvel de cera de carnaúba em éter de petróleo para que pudesse ser feita a análise por CCD.

LIU et al. (1994) determinaram a composição do sedimento de óleo de canola por TLC-FID (latroscan), utilizando três sistemas de eluição consecutivos: hexano:benzeno:acetona:ácido acético (44:30:0,8:0,3), acetona:água:ácido acético (70:1,2:1,5) e clorofórmio:metanol:água:ácido acético (50:28:3,1:0,3). No entanto, somente uma parte da amostra foi eluída, restando 17% no ponto de aplicação do bastão de sílica (“rod”). Nota-se que esses componentes não poderiam ser classificados como polares, pois não eluíram mesmo com a utilização de sistemas de solventes polares normalmente utilizados para separação de fosfolipídios. O alto ponto de fusão (75°C), responsável pela solidificação da amostra no “rod”, mesmo em soluções muito diluídas, é um fator limitante ao uso de TCL-FID, conforme observado por LIU et al. (1995).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tanto em fase normal quanto em fase reversa, tem sido utilizada para a separação de lipídios neutros e polares de origem animal ou vegetal. Em geral, a fase normal é utilizada para a separação de uma mistura em classes de lipídios, enquanto que os componentes de cada classe de lipídios podem ser separados em fase reversa.

Entretanto, o sistema de detecção consiste em um problema no caso de análise de ceras naturais (ROSSEL & PRITCHARD, 1991). A aplicação do detector na região do ultravioleta (UV) pode ser utilizada com gradiente de eluição, o que promove uma melhoria na separação dos componentes. No entanto, a aplicação do detector de UV é limitada a comprimentos de onda em torno de 210 nm. Apenas alguns componentes, como ésteres, aldeídos e cetonas, podem ser detectados neste comprimento de onda (ROSSEL & PRITCHARD, 1991). Os detectores de índice de refração (IR) têm aplicação limitada por não serem compatíveis com gradientes de eluição (KOLODZIEJCZYK, 2000). Outra razão para o lento desenvolvimento de técnicas de CLAE aplicadas à análise de ceras duras está relacionada à solidificação da cera nas linhas e colunas que são mantidas a temperatura ambiente, resultando em dados inconsistentes (HAMILTON, 1995).

O óleo de oliva pode apresentar traços de cera, sinal de adulteração com óleo extraído com solvente, daí a importância da determinação do teor de cera nesse produto. Como se trata de um produto líquido, a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode ser uma alternativa às técnicas de separação de ceras em coluna, resultando em boas condições de repetibilidade (AMELIO et al., 1993). O uso de CLAE permitiu a separação e identificação simultânea de ésteres de cera, isômeros de esqualenos e estigmastadienos (AMELIO et al., 1998).

A utilização de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massa (HRGC-MS) tem sido cada vez mais utilizada para a obtenção de um perfil de identidade de diferentes ceras. A utilização desta técnica permite a separação de misturas complexas e identificação de componentes de alto peso molecular (PEREIRA et al., 2000). Porém, a análise direta de amostras por HRGC-MS pode levar à perda de componentes termolábeis. É uma técnica bastante utilizada como ferramenta para classificação fitoquímica de amostras (PEREIRA et al., 1998).

Finalmente, amostras de cera foram analisadas por cromatografia em fluido supercrítico associada à espectrometria de massa (SFC – MS) por Hawthorne & Miller, 1987<sup>2</sup> (citados por KOLODZIEJCZYK, 2000). O método combina um sistema eficiente de separação a um sistema sensível de detecção, permitindo a identificação rápida dos vários componentes das ceras com peso molecular entre 300 e 1000 unidades de massa.

Como as ceras apresentam uma composição complexa, métodos combinados de análise devem ser utilizados (ROSSEL & PRITCHARD, 1991; LI & PARISH, 1998).

---

<sup>2</sup> HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J. *Journal of Chromatography*, 388, 397 (1987)

Vários estudos que tratam da separação de ceras em seus componentes por CCD ou cromatografia em coluna estão descritos na literatura científica. Os lipídios neutros da fração lipídica de farelo de arroz foram submetidos à cromatografia em coluna com sílica ácida e CCD para o isolamento dos ésteres de cera e ésteres de esterol por ITO et al. (1983). Os componentes isolados foram analisados por cromatografia gasosa, sendo identificado o linoleoil sitosterol, palmitoil sitosterol e linoleoil campesterol como principais ésteres de esterol. Os ésteres de cera apresentaram cadeias de 44, 46, 54 e 56 carbonos.

Um método para separação e determinação da composição dos álcoois graxos livres de diferentes fontes vegetais foi proposto por KAWANISHI et al. (1991). Cera de arroz, candelila, abelha, o extrato etéreo de casulo de bicho-da-seda e a fração solúvel de cera de carnaúba em éter de petróleo foram analisadas por CCD eluída com clorofórmio:metanol 1:2. Amostras foram aplicadas às placas e reveladas através de vaporização com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10%, seguido de aquecimento. Os álcoois foram separados dos demais componentes e identificados por cromatografia gasosa. As ceras de candelilla e carnaúba apresentaram cerca de 32 mg.kg<sup>-1</sup> de octacosanol (o álcool predominante), a cera de abelha, 16,4 - 21,9 mg.kg<sup>-1</sup> e a cera de arroz, 29,1 mg.kg<sup>-1</sup>.

A cera de abelha purificada teve seus componentes fracionados por CCD e o perfil de álcoois graxos presentes no material insaponificável foi caracterizado pela presença de C27:0, C28:0, C30:0, C31:0 e C32:0 como componentes principais. A adição da cera de abelha ou de seus insaponificáveis ao óleo de algodão apresentou efeito antioxidante no óleo mantido à temperatura ambiente por 16 dias (FARAG et al., 1993). Visando obter novos tipos de substâncias antioxidantes naturais, OSAWA & NAMIKI (1985) extraíram e caracterizaram a cera de folhas de eucalipto. Duas frações, eluídas com hexano e acetato de etila, apresentaram atividade antioxidante medida pelo método do tiocianato em sistemas água/óleo, mas nenhum dos componentes da cera mostrou efeito antioxidante medido pelo método de ganho de peso. Análises de CCD e de CLAE

indicaram as  $\beta$ -dicetonas de cadeia longa como responsáveis pela atividade antioxidante.

Para análise da composição dos ácidos e álcoois graxos esterificados, os ésteres de cera devem primeiramente sofrer uma etapa de hidrólise. Os álcoois e ácidos graxos são liberados e, depois de separados, podem ser analisados por cromatografia gasosa (BRIMBERG & WRETENSJO, 1979; MIWA, 1984; TONNET et al., 1984).

Uma grande quantidade de ésteres de cera insaturados está presente em ovas de peixes da espécie *Seriola aureovittata*. Os ésteres de cera isolados da fração lipídica em uma coluna de sílica gel com hexano/éter etílico (97:3 v/v) foram separados por CLAE. Após a transesterificação com ácido sulfúrico em metanol, os ácidos graxos foram separados em coluna (fase sólida  $\text{NH}_2$ ) e analisados por cromatografia gasosa, apresentando grande quantidade de C22:6 *n*-3 e dos álcoois graxos C16:0, C18:0 e C14:0 (JOH et al., 1995).

KIOSSEOGLOU & BOSKOU (1990) estudaram os ácidos graxos dos ésteres de cera de sementes de girassol, soja e tomate. Os lipídios das sementes foram extraídos com hexano (Soxhlet) e submetidos à cromatografia em coluna (eluição com hexano:éter etílico, 99:1) para separação da fração contendo os ésteres de cera e de esterois. A análise por CCD preparativa usando hexano:clorofórmio (7:3) para eluição permitiu a separação dos dois tipos de ésteres. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos, obtidos por transesterificação com  $\text{BF}_3$ , foram analisados por cromatografia gasosa. Foram encontrados ácidos graxos de 16 a 22 carbonos, sendo que as frações de ésteres de cera apresentaram maiores proporções de C22:0. Entretanto, os ésteres formados por longas cadeias saturadas presentes em amostras sólidas são muito resistentes à saponificação e muitas vezes os métodos utilizados não verificam satisfatoriamente a eficiência desta etapa.

O sedimento de óleo de canola foi separado por CCD com tolueno:clorofórmio (7:3) em ésteres de cera, triglicerídios, ácidos graxos livres e álcoois graxos por HU et al. (1993). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos provenientes dos triglicerídios e os álcoois graxos livres foram analisados por cromatografia gasosa, bem como os ésteres de cera, hidrolisados por saponificação exaustiva com álcali. A cera apresentou ácidos graxos de 16 a 28 carbonos, principalmente os de cadeia longa (C20:0, C22:0 e C24:0). Os álcoois graxos apresentaram cadeia entre 16 e 32 carbonos.

Assim como a saponificação exaustiva aplicada por HU et al. (1993), outros métodos para a derivatização de ceras incluem várias etapas, como etanólise, saponificação, metilação e extração dos álcoois e ésteres metílicos, exigindo um tempo mínimo de 4 a 5 horas para o preparo de cada amostra (MIWA, 1984; TONNET et al., 1984).

GRAILLE et al. (1986) apresentaram um estudo detalhado sobre as reações de etanólise e acetilação de cera de jojoba e propuseram um método simplificado para a análise da composição em ácidos e álcoois graxos, utilizando cromatografia gasosa e uma única injeção. Uma variação do método, com a etapa de preparo da amostra simplificada e redução no tempo da análise completa, foi publicada por PIOCH et al. (1986). Esses dois métodos utilizam-se do reagente de Grignard e eliminam o maior inconveniente dos métodos propostos por outros autores - o excessivo tempo requerido para a derivatização e a necessidade de duas análises de cromatografia gasosa.

Entretanto, o método de derivatização com o reagente de Grignard foi aplicado somente à cera de jojoba, que apresenta uma composição em álcoois e ácidos graxos relativamente simples e de fácil identificação, quando analisadas em uma única injeção no cromatógrafo. Em geral, a análise de amostras que apresentam composição mais complexa requer a separação prévia dos componentes antes da análise por cromatografia gasosa.

### 2.1.4.3. Propriedades térmicas de ceras

Além das características químicas, as propriedades térmicas também são importantes parâmetros a serem considerados na avaliação de diferentes ceras. As propriedades térmicas de maior interesse são os fenômenos de cristalização e fusão, que podem avaliados através da análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC) (BASSON & REYNHARD, 1988; CEBULA & SMITH, 1991).

Diferenças na transição de fases durante a fusão e cristalização de amostras de cera estão relacionadas a diferenças na sua composição. Em um estudo desenvolvido por LIU et al. (1996), o sedimento de óleo de canola, que consistiu em 72-74% de ésteres de cera, apresentou entalpia de transição de fases menor do que a apresentada pelo sedimento de girassol, composto por 99% de ésteres de cera. A entalpia de transição de fases mais alta pode, portanto, ser associada tanto à maior homogeneidade da amostra quanto à composição em classes de lipídios.

Em sistemas heterogêneos contendo vários componentes com diferentes características de fusão e cristalização, a temperatura de cristalização utilizada na separação de frações pode influenciar a composição dos cristais obtidos, como foi observado por LIU et al. (1995). Porém, mesmo amostras com pequenas diferenças quanto à porcentagem de ésteres de cera presentes podem apresentar propriedades térmicas bastante diferentes de acordo com a distribuição dos ácidos e álcoois graxos na molécula. Experimentos conduzidos com ceras sintéticas mostraram que os isômeros formados por álcoois e ácidos graxos de tamanho de cadeia parecido apresentaram maior ponto de fusão (Iyengar & Schlenk, 1969<sup>3</sup>, citados por LIU et al., 1995).

---

<sup>3</sup> IYENGAR, B. T. R.; SCHLENK, H. Melting points of synthetic wax esters. **Lipids**, v.4, p.28-30, 1969.

A avaliação do comportamento térmico de amostras por DSC mostra-se como uma ferramenta útil para a caracterização de ceras. A análise é simples, requer uma pequena quantidade de amostra (máximo 10 mg) e fornece indicações importantes para a comparação de amostras provenientes de diferentes fontes ou métodos de obtenção.

## **2.2. Cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é uma gramínea tropical formada pela hibridização de duas ou mais espécies do gênero *Saccharum*. Os cultivos iniciais da cana-de-açúcar foram dominados por um híbrido natural de *S. barbieri* e *S. officinarum*. Esta variedade, que era cultivada para uso industrial, foi descrita como *Saccharum officinarum* por Linnaeus e, a partir do século XVIII, foi reconhecida como uma variedade nobre e levada da Nova Guiné para outras regiões do mundo (IRVINE, 1977).

O cultivo da cana-de-açúcar representa uma atividade agrícola importante para o Brasil. O cultivo da cana-de-açúcar no Brasil teve início com a colonização portuguesa, sendo uma das primeiras culturas introduzidas no país com fins lucrativos (LUCCHESI, 1995). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e também é o maior exportador mundial de açúcar (CARVALHO, 1998). Em 2002, a produção de cana-de-açúcar atingiu 363 milhões de toneladas e espera-se uma safra de 379 milhões de toneladas para 2003 (IBGE, 2003). O uso do etanol como combustível renovável apresenta um grande potencial. No entanto, para que haja uma maior difusão do seu uso em termos mundiais, deve-se atentar para alguns aspectos. Os custos de produção devem ser reduzidos, com um cultivo mais racional da cana-de-açúcar e o uso de toda a energia estocada na cana-de-açúcar é um dever para garantir a imagem do etanol como combustível "limpo" e associado à idéia de proteção do meio ambiente. Daí, a importância da utilização de subprodutos da cana.

O processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e álcool envolve as etapas iniciais de extração do caldo e sua posterior purificação. Nesta etapa, o caldo sofre um processo de clarificação para a remoção das impurezas solúveis e insolúveis, geralmente através da utilização de CaO e aquecimento como agentes clarificantes. A separação das impurezas precipitadas geralmente é feita através de filtros rotativos, mas também pode ser feita de forma descontínua, com filtro-prensa. A torta resultante do filtro-prensa geralmente tem maior umidade (cerca de 80%) em comparação com a torta resultante de filtro rotativo (cerca de 65%) (IRVINE, 1977; PATURAU, 1989).

A quantidade e composição das tortas de filtro variam conforme a variedade da cana, processo de moagem, método de clarificação empregado e safra. A Tabela 3 apresenta os componentes normalmente presentes em tortas de filtro de cana.

Tabela 3. Composição típica de torta de filtro de cana-de-açúcar (expressa em % de matéria seca)

|                               | Teor (%) |
|-------------------------------|----------|
| Lipídios totais               | 5-14     |
| Fibras                        | 15-30    |
| Açúcares                      | 5-15     |
| Proteína                      | 5-15     |
| Cinzas totais                 | 9-20     |
| SiO <sub>2</sub>              | 4-10     |
| CaO                           | 1-4      |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 1-3      |
| MgO                           | 0,5-1,5  |

Fonte: PATURAU (1989)

A utilização das tortas de filtração do caldo está relacionada à diminuição do descarte de materiais e ao aproveitamento de um subproduto. Em geral, a torta de filtro é simplesmente espalhada sobre o campo de cultivo de cana-de-açúcar como fertilizante. No entanto, pode ser utilizada para a obtenção de cera, um produto de alto valor agregado.

### **2.2.1. Cera de cana-de-açúcar**

A cera da cana forma-se em depósitos, principalmente perto dos nós e das bainhas foliares, e tem a função de proteção contra a perda de água por evaporação. A cera representa uma pequena proporção em peso na planta (cerca de 0,12%) (PATURAU, 1989). LARIOS et al. (1993) realizaram um estudo sobre a distribuição da cera na cana-de-açúcar utilizando 3 variedades de cana, e encontraram um teor de cera maior nas folhas (1,87%) da cana. No entanto, considerando a massa de folhas e colmo por cada 100 kg de cana, o teor de cera no colmo representa 70% de toda a cera contida na cana.

Além da cera, outros lipídios em quantidades variáveis estão presentes no interior do colmo e em outras partes da planta. Quando a cana é moída, uma parte do material lipídico permanece no bagaço. Porém, cerca de 40% é arrastado como impureza e permanece em suspensão no caldo, concentrando-se na chamada torta de filtro (ADAMENAS, 1982; PATURAU, 1989).

A cera da cana, assim como outras ceras vegetais, consiste em uma mistura de ésteres de cera, ácidos graxos livres, álcoois graxos livres e triglicerídios. O principal álcool graxo é o octacosanol, representando mais de 60% dos álcoois graxos totais. Fitosteróis também podem estar presentes em quantidades variáveis, sendo o principal componente o  $\beta$ -sitosterol (NUISSIER et al., 2002; PATURAU, 1989).

No Brasil, não há aproveitamento da cera contida nas tortas de filtro, ao contrário do exemplo de Cuba, que possui programas para o desenvolvimento dos derivados da cana-de-açúcar. No que diz respeito à diversificação açucareira, há um conjunto de produtos, que em Cuba são muito difundidos, como os produtos obtidos da exploração do bagaço da cana (papel, resinas obtidas de furfural) e a cera da cana-de-açúcar. Atualmente, há inúmeros depósitos de patentes cubanas referentes a processos para obtenção e aplicação de componentes presentes na cera de cana. Na área médica, várias publicações de pesquisadores cubanos envolvendo o uso de componentes presentes na cera de cana-de-açúcar estão disponíveis na literatura científica. Entretanto, não foram encontrados dados sobre a produção comercial de cera de cana-de-açúcar em Cuba.

#### **2.2.1.1. Extração de cera de cana-de-açúcar**

A cera contida na torta de filtro de cana-de-açúcar pode ser recuperada juntamente com os lipídios totais através da extração com solvente. A primeira tentativa de se isolar cera de cana-de-açúcar das tortas de filtro foi feita em 1841 por Avequin, em New Orleans. Em 1909, um método básico de recuperação de cera de torta de filtro com solvente foi patenteado. Somente em 1916, na África do Sul, a cera de cana-de-açúcar começou a ser produzida industrialmente. No entanto, a produção foi encerrada alguns anos depois. Em 1958, três unidades de produção de cera de cana estavam em operação: duas em Cuba e uma na Austrália. A Austrália encerrou as atividades em 1960 devido aos altos custos de produção (PATURAU, 1989). Contudo, a obtenção da cera de tortas de filtro de cana-de-açúcar através de extração com diferentes solventes em escala laboratorial é o objetivo de alguns trabalhos recentes disponíveis na literatura científica.

Para a seleção do solvente de extração dos lipídios totais de uma matriz deve-se levar em consideração a quebra de qualquer ligação existente entre eles

e os componentes não lipídicos. Por isso, a escolha apropriada do solvente é importante (JOHNSON & LUSAS, 1983):

- *solventes orgânicos apolares* (como clorofórmio e hexano): para quebrar interações hidrofóbicas e de dipolo (por exemplo, entre aminoácidos apolares e lipídios)
- *solventes orgânicos polares*: com alta constante dielétrica (como metanol e etanol): promovem a quebra de pontes de hidrogênio (por exemplo, grupos carboxila-, hidroxila- e amino- de um lipídio)
- *solventes não neutros* (pH ácido ou alcalino): promovem a quebra de ligações iônicas, podendo levar à formação de estruturas complexas.

A extração pode ser contínua (por percolação) ou intermitente, e o seu rendimento depende dos procedimentos de extração utilizados (tipo de solvente, temperatura de extração, relação entre solvente e soluto) e das características da matriz que está sendo extraída (tamanho de partícula e umidade). A composição dos lipídios extraídos varia, também, com a duração do período de extração (KARNOFSKY, 1949; BERNARDINI, 1976).

Vários solventes foram utilizados para a extração de cera de tortas de filtro de cana-de-açúcar. Amostras de cera de coloração verde muito escura, compostas por uma fração mole, uma fração dura e resinas foram obtidas através de extração com benzeno (Abdal-Akher et al., 1977<sup>4</sup>, citados por AZZAM, 1984). O rendimento em cera bruta variou de 10,1 a 20,5%, mas nenhuma análise de caracterização da cera obtida foi apresentada.

AZZAM (1984) utilizou amostras de tortas de filtração coletadas em usinas do Egito para a extração da cera com diferentes solventes: tolueno, naftaleno,

---

<sup>4</sup> ABDAL-AKHER, M. et al. **Chem. Mikrobiolo. Tech. Lebesm.** v.5, n.42, 1977.

gasolina e álcool refinado. Realizou ensaios de extração descontínua, com amostras de 200 g de torta seca e relação torta:solvente entre 1:6 e 1:8, obtendo rendimentos de 10,50 a 14,55% em cera bruta, com pontos de fusão entre 74 e 81°C. As ceras apresentaram cor verde muito escura, devido à presença de clorofila.

NUISSIER et al. (2002) utilizaram o resíduo de fermentação e destilação de cana-de-açúcar para a extração com ciclohexano, obtendo rendimento de 7% em cera bruta. Não foi apresentada a caracterização química da cera obtida. O preparo da amostra envolveu a filtração do resíduo de fermentação e destilação sobre terra de “fuller”, secagem a 50°C e moagem do material. A amostra preparada, com grau de umidade não indicado, foi extraída em equipamento tipo Soxhlet, à temperatura ambiente, durante o período de 20 horas.

BUTTAR et al. (1999) utilizaram hexano, tolueno, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol para a extração de cera de torta de filtro de cana em extrator tipo Soxhlet. Utilizaram tortas com 5% de umidade, obtendo rendimentos de 8,3% (utilizando hexano) a 20,1% (utilizando metanol) em cera bruta, com índice de acidez de 29,0 a 67,3 mg KOH.g<sup>-1</sup> e índice de saponificação de 109,4 a 170,1 mg KOH.g<sup>-1</sup>. Os autores associaram o aumento da polaridade do solvente utilizado na extração às diferenças nos índices analíticos apresentados pelas ceras.

A extração industrial de cera de cana a partir de tortas de filtro pode ser realizada em unidades de extração de óleo adaptadas, em equipamentos para extração contínua como rotocélulas. Entretanto, a eficiência da extração de cera é baixa, cerca de 70% (PATURAU, 1989). Segundo AZZAM (1984), o método de extração contínua de cera de cana-de-açúcar pode trazer dificuldades mecânicas relacionadas à transferência do material, devido ao alto ponto de fusão da cera.

### 2.2.1.2. Purificação de cera de cana-de-açúcar

Os métodos de refino descritos na literatura para promover uma descoloração da cera de cana-de-açúcar incluem o uso de ácidos fortes (ácido sulfúrico, nítrico e crômico) e destilação sob vácuo alto (AZZAM, 1986; PATURAU, 1989; WARTH, 1947). O uso de ácidos fortes está relacionado a problemas ambientais e, por isso, é cada vez mais evitado pelas indústrias.

PHUKAN & BORUAH (1999) apresentaram um processo conduzido em escala laboratorial utilizando carvão ativo como agente descolorante. A cera de cana foi extraída da torta de filtro com tetracloreto de carbono ou tolueno, sob refluxo, durante um período de 4 horas. O preparo da matéria prima para extração não foi relatado pelos autores. Após a evaporação do solvente, a cera bruta foi dissolvida em isopropanol e filtrada para eliminação da porção de resina. A cera resultante foi tratada com uma solução de carvão ativo 10-15 g.L<sup>-1</sup>, durante 2 horas, em um sistema sob refluxo. O carvão foi removido por filtração e a solução resultante, resfriada para a precipitação da fração de cera dura, que foi separada por filtração e lavada com isopropanol (3 a 5 vezes). Os autores obtiveram rendimentos de 3,5 a 4,8% em cera de coloração amarelo-clara e índice de acidez em torno 6 mg KOH.g<sup>-1</sup>.

A aplicação desses métodos de refino pode apresentar alguns inconvenientes, como, por exemplo, a necessidade da utilização de vários insumos de processo para a obtenção de uma cera sem impurezas. O uso de solventes polares na extração transfere compostos polares para a cera bruta, que obrigatoriamente devem ser removidos para que seja obtida uma cera de boa qualidade tecnológica. A necessidade desta e outras etapas de refino promove aumento no custo do processo.

Uma opção para a obtenção de uma cera de coloração clara e livre de resinas é a aplicação do fracionamento com solvente. A cristalização fracionada é um processo termo-mecânico de separação, em que os componentes de uma

amostra são separados, normalmente como uma mistura, através da cristalização parcial em uma fase líquida. Existem três tipos de fracionamento térmico: fracionamento sem adição de solvente ou fracionamento a seco, fracionamento com detergente e fracionamento com solvente orgânico (THOMAS, 1985).

No fracionamento com solvente, o crescimento dos cristais é mais rápido, pois há redução na viscosidade do sistema, o que leva a uma maior mobilidade das moléculas e a uma aceleração da cristalização (DEFFENSE, 1985). Por esse motivo, quando um fracionamento mais completo é exigido para a obtenção de produtos de maior pureza ou melhoria no rendimento, o fracionamento com solvente é empregado. No caso de fracionamento de substâncias duras como as ceras, o uso de solvente é imperativo (WAKELYN, 2001).

O solvente mais utilizado para o fracionamento de lipídios é o hexano. Este solvente é utilizado na indústria de óleos e gorduras para a extração do óleo de grãos e, por esse motivo, é facilmente aceito pela indústria (THOMAS, 1985). Frações mais específicas podem ser obtidas com o uso de solventes seletivos, como a acetona ou o isopropanol. Após a cristalização, as frações são separadas por filtração e a recuperação do solvente realizada por destilação (DEFFENSE, 1985).

O fracionamento com solventes seletivos é muito eficiente em casos específicos, por exemplo no fracionamento contínuo de lecitina bruta com acetona (1:10 a 1:20), em que os fosfolipídios insolúveis em acetona são precipitados e separados dos triglicerídios, ácidos graxos e outros lipídios neutros (WAKELYN, 2001). Apesar de proporcionar bons resultados, o uso de acetona gera problemas operacionais para aplicação em nível industrial, devido ao seu baixo ponto de ebulição, o que exige medidas de segurança para evitar a perda de vapores (THOMAS, 1985).

Há relatos na literatura sobre a purificação de cera de cana-de-açúcar através de cristalização em acetona, etanol, etanol:nafta e isopropanol. O

processo aplicado na Austrália nos anos 1958-1960 envolvia a mistura de cera de cana com etanol:éter de petróleo, 80:20 (relação cera:solvente de 1:10, p/v) e separação da fração precipitada a 18-25°C. O sedimento era constituído por ceras e resinas, havendo então a necessidade de uma etapa de extração para a separação das resinas. Outros processos envolvem a suspensão de cera em acetona sob aquecimento, resfriamento do sistema e separação do material decantado, também composto pela fração dura de cera e resinas, se presentes (PATURAU, 1989; WARTH, 1947).

AZZAM (1984), obteve frações de cera de coloração clara através do resfriamento da miscela proveniente da extração de tortas de filtro de cana-de-açúcar com diferentes solventes. Após a lavagem das frações (obtidas a 15°C) com acetona, o autor obteve amostras com índice de acidez de 7,6 mg KOH.g<sup>-1</sup> e ponto de fusão de 80 a 83°C. A cera bruta, que não sofreu o processo de fracionamento, apresentou índice de acidez de 28,7 mg KOH.g<sup>-1</sup> e ponto de fusão de 77 a 81°C.

Os parâmetros de controle mais importantes nos processos de fracionamento são a temperatura de cristalização, a velocidade de resfriamento do sistema e a velocidade de agitação. A temperatura de cristalização depende das propriedades térmicas e da composição da amostra a ser fracionada (LUCCAS, 2001; DIMICK & MANNING, 1987). A velocidade de resfriamento tem influência direta na forma e tamanho dos cristais formados, na composição das frações e no rendimento do processo. A velocidade de resfriamento aplicada ao fracionamento de gorduras deve estar entre 0,01 °C.min<sup>-1</sup> e 1,0 °C.min<sup>-1</sup> (LUCCAS, 2001). Para o caso de fracionamento de cera, não foram encontradas indicações na literatura sobre as velocidades de resfriamento mais adequadas.

A velocidade de agitação durante a cristalização também tem influência na formação e crescimento dos cristais. À medida que os cristais começam a crescer, a viscosidade do meio aumenta e a transferência de calor no sistema diminui. A

velocidade de agitação deve ser suficiente para promover a cristalização homogênea dentro do reator. Porém, se for muita alta, pode impedir a formação de cristais ou destruir os cristais já formados. O ideal é que esteja entre 10 e 20 rpm, não ultrapassando 30 rpm (LUCCAS, 2001).

### **2.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de compostos que têm sido continuamente objeto de interesse, devido aos seus potenciais mutagênicos e carcinogênicos. Os HPAs são resultantes principalmente da combustão incompleta de matéria orgânica, em parte de fontes naturais, como queimadas em florestas e processos geoquímicos. Entretanto, a poluição ambiental (tráfego, sistemas de aquecimento, atividades industriais, vazamentos de óleo), alguns tipos de processamentos (defumação, secagem direta com madeira, torrefação) e materiais de embalagem também são responsáveis pela presença de HPAs em alimentos (CAMARGO & TOLEDO, 2002; GROVA et al., 2002).

Exemplos de HPAs incluem o benzo-*a*-antraceno, benzo-*a*-pireno, benzo-*b*-fluoranteno, benzo-*k*-fluoranteno, benzo-*g,h,i*-pireno, criseno, fluoranteno e pireno. Dentre estes, o benzo-*a*-pireno, benzo-*a*-antraceno, benzo-*b*-fluoranteno e benzo-*k*-fluoranteno são comprovadamente carcinogênicos em animais experimentais (IARC, 1983). Tais poluentes orgânicos podem migrar através da cadeia alimentar e se acumular nos lipídios ao final da cadeia (GROVA et al., 2002).

No estado de São Paulo, a principal fonte de emissão de material particulado e de material em fase gasosa tem origem na queima dos canaviais (FRANCO, 2001). Devido a essa prática, há a possibilidade de HPAs estarem

presentes na cera, o que torna importante sua quantificação em produtos provenientes de cana-de-açúcar.

SERRA et al. (1995) determinaram o teor de HPAs em amostras de cana-de-açúcar e produtos derivados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na cana crua não foi detectada a presença de HPAs, mas o benzo-a-pireno foi detectado nas duas amostras de cana queimada (teor de  $0,10\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Os teores de HPAs totais encontrados nas amostras de açúcar cristal, demerara e mascavo variaram de 1,3 a  $21,6\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Os resultados forneceram indicação de que os HPAs originários da matéria prima podem ser concentrados durante o processo, ou que as condições do processamento podem levar à formação desses hidrocarbonetos.

A determinação do teor de HPAs em lipídios pode ser realizada por cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, o processo de extração dos HPAs envolve algumas etapas (saponificação, extração e purificação) que podem causar uma considerável perda de material e, conseqüentemente, uma quantificação errônea. Para evitar problemas analíticos associados à extração dos HPAs, PIOMBO & MOREAU (2001) realizaram a análise direta de material lipídico por CLAE, com a utilização de duplo sistema de detecção. O princípio da separação baseou-se na capacidade da fase estacionária de colher os elétrons  $\pi$  dos anéis aromáticos. Os diferentes HPAs foram separados de acordo com o número e posição dos anéis e detectados por fluorescência. A detecção no espectro UV serviu de auxílio para a confirmação de alguns picos.

#### **2.4. Considerações sobre planejamento experimental**

Atualmente existe uma crescente necessidade de diminuição dos custos de produção e obtenção de maiores rendimentos, sem perda apreciável na

produtividade. O uso de ferramentas para a otimização de processos de maneira racional deve permitir um melhor conhecimento das variáveis de processo.

O planejamento experimental é utilizado para análise de processos em que diversas variáveis independentes (fatores) influenciam uma variável dependente (resposta), permitindo a identificação de relações matemáticas e estatísticas entre níveis pré-determinados das variáveis (THOMPSON, 1982).

Os métodos de planejamento experimental mais conhecidos são o simplex, o planejamento fatorial e o método de análise por superfície de resposta. A otimização de um processo por análise de superfícies de resposta é baseada no planejamento fatorial. Consiste em um grupo de técnicas aplicadas ao estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas (como rendimento e produtividade), que possam ser medidas analiticamente, e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas. Através dessas técnicas pode-se avaliar como uma resposta numa região de interesse é afetada por um conjunto de variáveis de entrada (BARROS NETO et al., 1996; CURRALERO, 2000).

Em um processo de extração ou de purificação um grande número de variáveis pode influenciar o rendimento e produtividade do processo. Um estudo feito através de uma metodologia de tentativa e erro, além de não levar em conta os efeitos de interação entre os parâmetros, seria inviável sob o ponto de vista operacional. Assim, a análise de superfícies de resposta mostra-se como uma ferramenta importante (KALIL, 2000).

O planejamento fatorial consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada e, então, executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como é desejável a redução do número de ensaios ao mínimo possível, utiliza-se um planejamento fatorial com 2 níveis (-1 e +1) para cada variável independente. Se “n” variáveis estiverem envolvidas no estudo de um determinado processo, o número de ensaios a ser realizado para se investigarem as combinações possíveis entre as variáveis será  $2^n$ . Em um estudo

com 3 variáveis independentes haveria 8 ensaios, referentes aos 8 pontos fatoriais que formam os vértices de um cubo, cujo ponto central coincide com a origem das coordenadas. Para se estimar o erro experimental acrescenta-se, no mínimo, 3 ensaios referentes ao ponto central, utilizando-se os valores codificados relativos ao nível zero. Com os resultados obtidos após a execução dos ensaios é possível calcular os efeitos principais e as interações entre as variáveis independentes, determinar quais são os efeitos significativos e ajustar um modelo matemático de 1ª ordem para correlacionar variáveis independentes e respostas (BARROS NETO et al., 1996).

É possível ainda completar o planejamento, realizando ensaios referentes aos pontos axiais, situados a uma distância codificada  $\alpha$  ( $\alpha=2^{n/4}$ ) do ponto central. Esses pontos situam-se sobre os eixos das coordenadas e a distância corresponde à metade da diagonal do cubo. Com os resultados é possível aplicar a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e análise de regressão múltipla para se estabelecerem modelos matemáticos de 2ª ordem, contendo os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes (BARROS NETO et al., 1996). A avaliação do modelo obtido deve ser feita através de análise estatística, utilizando como parâmetros o coeficiente de correlação da regressão e o valor estimado para o teste F (BOX et al., 1978).

A análise dos resultados de variância (ANOVA) permite a verificação da significância dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas e também do ajuste do modelo matemático obtido. Um modelo ideal deve ter boa significância ( $p \leq 0,05$ ), alta confiabilidade (dados dentro do intervalo de confiança de 95%) e baixa variabilidade ( $R^2 \geq 70\%$ ) (BARROS NETO et al., 1996).

A fórmula geral deste modelo é representada pela equação:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \bullet$$

Onde: Y = resposta (variável dependente)

$x_1, x_2, x_3$  = níveis codificados das variáveis independentes

$\beta_0$  = ponto central

$\beta'_s$  = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados

$\bullet$  = resíduo que mede o erro experimental, apresentando uma distribuição normal com média zero e variância igual a  $S^2$

### **3. Material, Métodos e Procedimento Experimental**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Matéria-prima**

Tortas de filtro, obtidas pelo processo de filtração do caldo de cana-de-açúcar em filtros rotativos, foram fornecidas por usinas cooperadas da Copersucar. Foram utilizados dois tipos de tortas de filtro:

- proveniente de cana produzida em sistema orgânico, e portanto não queimada antes do corte, pela Usina São Francisco, Sertãozinho – SP, consistindo em uma mistura das seguintes variedades de cana-de-açúcar: SP 80-1842, SP 81-3250, SP 79-1011, SP 80-1816 e SP 83-5073. É denominada “cana orgânica”.
- proveniente de uma mistura de cana queimada e de cana não queimada (aproximadamente 50% de cana queimada e 50% de cana não queimada), processada pela Usina São Martinho – SP. É denominada “cana queimada”.

Os dois tipos de torta foram provenientes de um processamento que não envolveu a etapa de lavagem da cana antes da extração do caldo. O tratamento do caldo consistiu somente no uso de polímero como coadjuvante na clarificação. As tortas de filtro foram processadas na safra do ano 2000. Amostras comerciais de ceras de abelha e de carnaúba foram cedidas pela Ceralit, Campinas - SP.

### **3.1.2. Vidrarias, reagentes e equipamentos**

Todos os reagentes químicos utilizados apresentaram grau de pureza concordante com as especificações constantes nos métodos analíticos. Foram utilizados equipamentos e vidraria de uso rotineiro em laboratório. Os equipamentos utilizados nas análises cromatográficas e térmicas estão especificados no item 3.2. Os equipamentos utilizados nos processos de extração de cera estão descritos no item 3.3

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Caracterização das tortas de filtro**

As tortas de filtro foram caracterizadas quanto ao grau de umidade, segundo o método AOCS Ac 2-41 e teor total de lipídios, segundo o método AOCS Ac 3-44.

### **3.2.2. Caracterização física e química das ceras**

Devido ao alto ponto de fusão apresentado pelas amostras comerciais e pelas ceras de cana-de-açúcar, foram utilizados métodos adaptados. Em geral, houve necessidade de alteração do solvente de dissolução da amostra e redução da massa de amostra utilizada, para a obtenção de soluções menos concentradas. Como a redução da massa de amostra utilizada pode contribuir para o aumento do erro experimental, as determinações analíticas descritas a seguir foram realizadas com 5 repetições.

- *Teor de fósforo (colorimétrico)*: foi determinado pelo método AOCS Ca 12-55 e não necessitou adaptação.

- *Índice de acidez*: o método AOCS Ca 5a-40 foi adaptado segundo LI & PARISH (1998) - aproximadamente 1,0 g de amostra foi colocado em erlenmeyer de 125 mL e dissolvido em 20 mL de etanol:toluol, 1:1. A mistura foi aquecida para a fusão da cera e titulada com solução padronizada de NaOH, 0,05 N, com indicador fenolftaleína. O índice de acidez, expresso em mg de KOH necessários para neutralizar 1 g de amostra, foi calculado seguindo a fórmula:

$$IA \text{ (mg KOH.g}^{-1}\text{)} = V \times N \times 56,1 / m$$

onde: V = volume gasto com a titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução

m = massa da amostra (g)

- *Índice de saponificação*: o método AOCS Cd 3-25 foi adaptado segundo LI & PARISH (1998) - cerca de 0,5 g de amostra foi colocada em balão de 250 mL, foram adicionados de 20 mL de toluol e de 10 mL de solução de KOH etanólica 0,5 M. A solução foi mantida sob refluxo por 4 horas e, após o resfriamento, titulada com solução padronizada de HCl 0,5 N. Fenolftaleína foi usada como indicador. Preparou-se um branco, sem amostra. O índice de saponificação foi calculado seguindo a fórmula:

$$IS \text{ (mg KOH.g}^{-1}\text{)} = [(B-V) \times N \times 56,106] / m$$

sendo: B = volume gasto na titulação do branco (mL)

V = volume gasto na titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução

m = massa da amostra (g)

- *Determinação da matéria insaponificável:* método AOCS Ca 6a-40 adaptado para o presente trabalho - 0,5 g amostra foi colocado em balão de fundo redondo de 125 mL. Adicionaram-se 1,5 mL de KOH aquoso 50% e 25 mL de álcool etílico. A solução foi mantida sob refluxo durante 8 horas e transferida para funil de separação de 500 mL, com a adição de 50 mL de água aquecida (40°C) e 50 mL de éter etílico. A fase etérea foi separada da fase aquosa, que foi extraída mais 3 vezes com porções de 50 mL de éter etílico. As frações de éter foram juntadas, a fase etérea foi transferida para balão tarado e a porcentagem de matéria insaponificável determinada gravimetricamente.
  
- *Índice de iodo segundo Wijs:* método AOCS Cd 1d-92 adaptado para o presente trabalho - 0,5 g de amostra foi colocado em erlenmeyer de 500 mL, adicionado de 7,5 mL de ciclohexano e aquecido em placa aquecedora até a dissolução total da amostra. Após o resfriamento, foram adicionados 7,5 mL de ácido acético e 25 mL de solução de cloro-iodo segundo Wijs. O frasco foi tampado e mantido no escuro por 1 hora. Foram adicionados 20 mL de solução de KI 10% e 150 mL de água destilada. A amostra foi titulada com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1 N, com solução de amido 1% como indicador. Preparou-se um branco, sem amostra. O índice de iodo, expresso em mg de iodo absorvido por 100 mg de amostra, foi calculado pela fórmula:

$$II \text{ (mg I.100 mg}^{-1}\text{)} = [(B - V) \times N \times 12,69] / m$$

sendo: B = volume gasto na titulação do branco (mL)

V = volume gasto na titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução

m = massa da amostra (g)

- *Teor de clorofila*: método AOCS Cc 13d-55 adaptado para o presente trabalho - o método utilizado para determinar o teor de clorofila e pigmentos relacionados (principalmente feofitina) em óleos através de absorção espectrofotométrica a 630, 670 e 710 nm foi adaptado para a aplicação em ceras. Amostras de cera foram dissolvidas a quente em diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), utilizando-se balões volumétricos de 10 mL. A concentração da solução foi ajustada para que os valores de absorbância pudessem ser registrados sem que houvesse precipitação das ceras durante a análise. As soluções foram filtradas a quente (papel de filtro Whatman nº 2) imediatamente antes da análise. Foi utilizado espectrofotômetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 20. O teor de clorofila e pigmentos relacionados foi dado pela fórmula:

$$\text{Clorofila (mg.kg}^{-1}\text{)} = [A_{670} - (A_{630} + A_{710})/2] / [(0,0964 \times L) \times f]$$

onde: L = comprimento da cubeta (cm)

f = fator de concentração

A = leitura da absorbância em cada comprimento de onda

- *Teor e composição em tocoferóis e tocotrienóis* - método AOCS Ce 8-89: foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer LC 250, equipado com detector de fluorescência Shimadzu, com excitação de 290 nm e emissão de 330 nm, e com coluna Merck de 25 cm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com LiChrosorb Si 60. Fase móvel: hexano:isopropanol (99:1, v/v), com fluxo de 1,1 mL.min<sup>-1</sup>. Os tocoferóis foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos picos de amostras de padrões injetadas nas mesmas condições. A quantificação foi realizada através da relação da área do pico contra a concentração do respectivo tocoferol, através de curva padrão, obtida nas mesmas condições. As amostras

de cera foram diluídas em hexano e filtradas em membrana Millipore PTFE, 0,22 µm de poro, imediatamente antes da injeção no cromatógrafo.

### 3.2.3. Avaliação do comportamento térmico das ceras

Foram determinadas as curvas de fusão e cristalização das ceras em um calorímetro diferencial de varredura (Differential Scanning Calorimeter – DSC) Perkin Elmer modelo Delta Series DSC7, com *software* acoplado. Para realização das análises foi utilizada a metodologia proposta por PRZYBYLSKI et al. (1993) com pequenas modificações. As análises foram feitas com 5 mg de amostra em cápsulas de alumínio hermeticamente seladas e utilizando ar como referência, seguindo as seguintes condições: cristalização - 5 min a 100°C, 100°C a 5°C com taxa de resfriamento de 10°C.min<sup>-1</sup>; fusão - 1 min a 5°C, 5°C a 100°C com taxa de aquecimento de 5°C.min<sup>-1</sup>.

Os termogramas obtidos foram normalizados com base na massa das amostras. Através da análise dos termogramas normalizados foram determinados os seguintes parâmetros: temperatura de início de fusão/cristalização – *Tonset* (°C), temperatura de pico - *Tpico* (°C), altura máxima do pico (W.g<sup>-1</sup>) e entalpia de transição de fases -  $\Delta H$  (J.g<sup>-1</sup>). Curvas de teor de sólidos foram construídas com base nos termogramas de fusão das amostras, determinando-se a porcentagem de área relativa ao teor de sólidos a cada 5°C. As análises foram conduzidas em duplicata.

### 3.2.4. Composição em ácidos e álcoois graxos

Foi utilizado o método proposto por PINA et al. (1987), com modificações para promover a hidrólise total dos ésteres de cera e proporcionar maior facilidade operacional. As amostras foram derivatizadas na presença do reagente de

Grignard, que reage com os grupamentos éster da cera, convertendo os ácidos graxos em álcoois terciários, enquanto que os álcoois graxos permanecem como álcoois primários. Ao contrário de outros procedimentos encontrados na literatura (MIWA et al., 1984; JOH et al., 1995), a reação com o reagente de Grignard processa-se em um curto período de tempo. A reação foi realizada sob condições anidras. Os produtos resultantes foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) analítica para atestar a eficiência da reação. Os álcoois primários e terciários foram separados por CCD preparativa e analisados por cromatografia gasosa.

#### ***Derivatização com reagente de Grignard***

A reação foi conduzida à temperatura ambiente, em tubos perfeitamente secos (20 mL de capacidade), fechados com tampa rosqueável. Amostras de 20 mg de cera foram dissolvidas a quente em 2 mL de éter etílico anidro (adicionado de sulfato de sódio). Um excesso estequiométrico de reagente de Grignard (800 µL de uma solução 3,0 M de brometo de etila e magnésio em éter etílico) foi adicionado e a mistura foi agitada em vortex. O andamento da reação foi monitorado através de cromatografia em camada delgada (CCD), que indicou 40 minutos como tempo necessário para conversão de todos os ésteres presentes nas amostras analisadas. Após 40 min, com agitação ocasional, a reação foi interrompida através da adição de 300 µL de ácido acético, sendo necessário o resfriamento do tubo em banho de gelo (0°C) durante essa etapa. Foram adicionados 2 mL de solução aquosa 0,4 M de ácido bórico e a solução foi agitada em vortex. Após a separação de fases, a fase superior, contendo os álcoois primários e terciários, foi recolhida em um segundo tubo e lavada com 2 mL de solução de bicarbonato de sódio 2%:ácido bórico 0,4 M (1:1), com cuidado durante a agitação para não formar emulsão. A fase superior foi recuperada, o solvente evaporado sob nitrogênio em evaporador automático (N-Evap II nitrogen evaporator, Organomation Associates) e os produtos derivados diluídos em 1 mL

de éter etílico. O fluxograma a seguir (Figura 3) ilustra o esquema da derivatização.

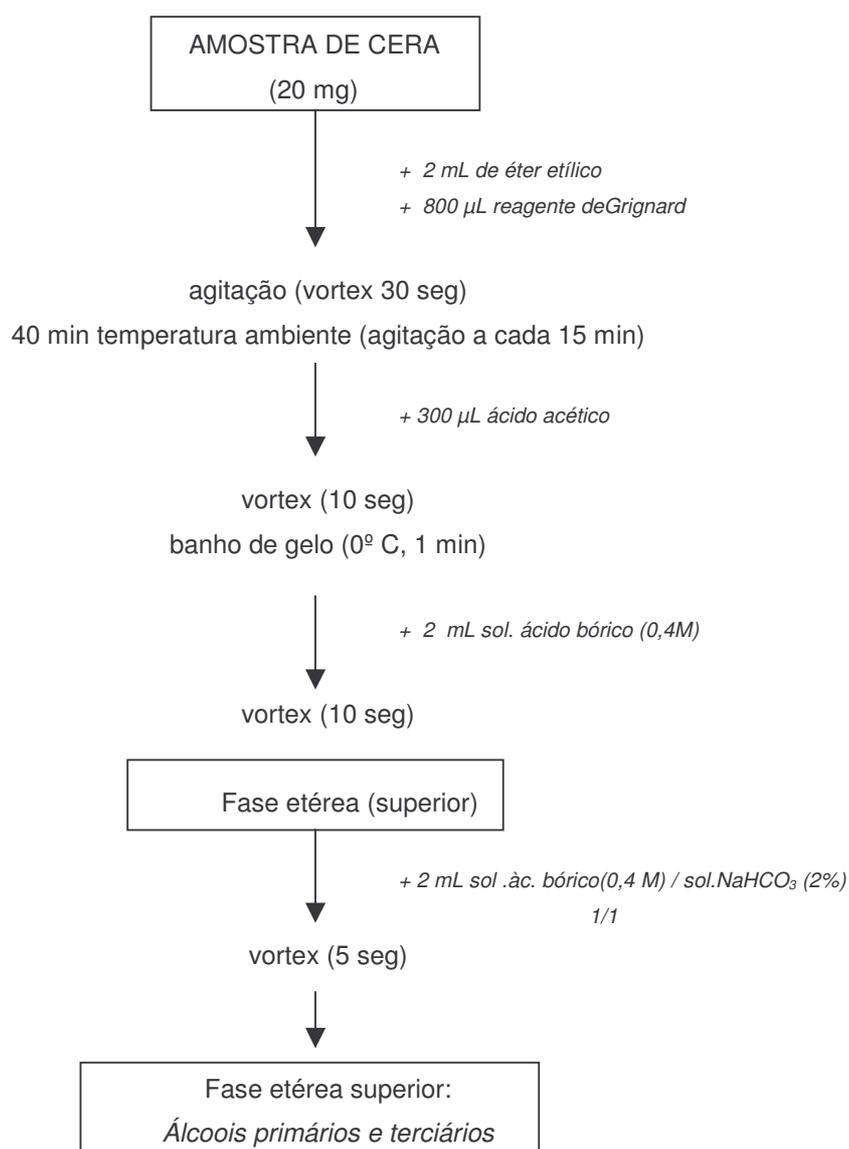


Figura 3. Esquema de derivatização de cera com reagente de Grignard

### ***Cromatografia em camada delgada (CCD)***

As análises de CCD analítica foram realizadas em placas de sílica gel de 50 x 100 mm ou 100 x 200 mm (Si G 60, Merck), utilizando-se hexano:éter etílico:ácido acético (60:40:0,5) como fase móvel. Amostras de cera derivatizada (5 a 10 µL) foram aplicadas com aplicador automático (Camag Linomat IV). As manchas foram localizadas através da vaporização das placas com uma solução saturada de sulfato de cobre: ácido fosfórico (1:1), seguida de aquecimento em estufa a 200°C durante 10 min. A identificação dos componentes foi baseada no tempo de retenção (Rf) de padrões autênticos (colesteril palmitato, estearil palmitato, triestearina, esqualeno, eicosanol, ácido oléico - Sigma) eluídos nas mesmas condições.

As análises de CCD preparativa foram desenvolvidas em placas de sílica gel de 20 x 20 cm e 0,50 mm de espessura (Si G 60, Merck), utilizando-se hexano:éter etílico:ácido acético (60:40:0,5) para eluição. A amostra de cera derivatizada (400µL) foi aplicada em uma banda estreita ao longo da placa. As bandas foram localizadas através da revelação de uma parte da placa, utilizando-se o mesmo reagente usado nas análises de CCD analítica. As diferentes bandas foram raspadas, a sílica foi colocada em tubos (5 mL de capacidade) e os componentes foram extraídos 2 vezes com clorofórmio a quente (80°C). Após a extração, os tubos foram centrifugados (4000 rpm, 5 min), o solvente coletado foi evaporado sob nitrogênio (N-Evap II nitrogen evaporator, Organomation Associates) e substituído por 1 mL de éter etílico. As soluções de cada um dos componentes recuperados foram filtradas em membrana (Millipore Millex FH 0,45 µm) e submetidas à análise por CCD analítica para verificação da eficiência da separação antes da análise por cromatografia gasosa. As análises foram realizadas em duplicata.

### ***Cromatografia gasosa***

Os álcoois primários foram analisados em cromatógrafo gasoso (GC 6000 Vega Series 2, Carlo Erba) equipado com detector de ionização de chama (FID) e injetor com “split”. Os componentes foram separados em uma coluna HP-SIMDIST (J & W Scientific: comprimento, 15 m; diâmetro interno, 0,53 mm Megabore; espessura de filme, 0,15  $\mu\text{m}$ ). Amostras de 1,0  $\mu\text{L}$  foram injetadas (taxa de “split” 1:25). A temperatura do detector foi mantida a 350°C e do injetor a 300°C. Hélio foi usado como gás de arraste a 10 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do forno foi mantida a 140°C por 1 min, programada para atingir 360°C a 8°C.min<sup>-1</sup> e mantida a 360°C por mais 10 min. A identificação dos picos foi baseada no tempo de retenção de padrões autênticos (eicosanol, 1-octacosanol e triacontanol - Sigma) e a integração por normalização de áreas foi feita em um integrador Merck D-2500.

Os álcoois terciários foram analisados por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC Carlo Erba Strumentazione) com detector de ionização de chama. A separação foi feita em uma coluna RTX-1 (RESTEK, fase dimetil polisiloxano: comprimento, 3m; diâmetro interno, 0,32mm; espessura de filme, 0,25  $\mu\text{m}$ ). Amostras de 0,5  $\mu\text{L}$  foram injetadas por meio de injetor “on-column”. O detector foi mantido a 350°C. Hélio foi usado como gás de arraste a 7 mL.min<sup>-1</sup>. O forno foi mantido a 140°C por 1 min, programado para atingir 320°C a 6°C.min<sup>-1</sup> e mantido a 320°C por mais 10 min. A integração dos picos foi feita em integrador Merck D-200. A identificação dos picos foi realizada com base nos valores de tempo de retenção obtidos a partir de amostras de composição conhecida (jojoba e oliva), analisadas nas mesmas condições. Os valores de tempo de retenção foram utilizados para a construção de curvas de número de carbono equivalente, que auxiliaram na identificação dos componentes das amostras.

### ***Quantificação de octacosanol***

Para determinação quantitativa de octacosanol (livre e esterificado), a cerca de 20 mg de amostra de cera foram adicionados 6,0 mg de eicosanol

(solução em éter etílico) como padrão interno. A amostra foi derivatizada conforme o procedimento descrito para análise de ácidos e álcoois graxos. Uma curva analítica com cinco concentrações diferentes de octacosanol foi obtida através de análise de regressão. A concentração de octacosanol nas amostras foi calculada com base na área do padrão interno, a partir da equação da curva em função da relação de área dos picos. As análises foram conduzidas em triplicata.

### 3.2.5. Identificação e quantificação de esteróis

Para determinação quantitativa de esteróis (livres e esterificados), a 25 mg de amostra de cera foram adicionados 2,0 mg de colesteril palmitato (solução em hexano) como padrão interno. A amostra foi derivatizada conforme o procedimento descrito para análise de ácidos e álcoois graxos. A banda relativa aos esteróis recuperada após CCD preparativa foi analisada por cromatografia gasosa.

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso de alta resolução (HRGC Carlo Erba Strumentazione) equipado com detector de ionização de chama. A separação foi feita em uma coluna RTX-1 (RESTEK, fase dimetil polisiloxano: comprimento, 3m, diâmetro interno, 0,32mm, espessura de filme, 0,25  $\mu\text{m}$ ). Amostras de 0,5  $\mu\text{L}$  foram injetadas por meio de injetor "on-column". O detector foi mantido a 350°C. Hélio foi usado como gás de arraste a 7 mL.min<sup>-1</sup>. O forno foi mantido a 180°C por 1 min, programado para atingir 300°C a 5°C.min<sup>-1</sup>. A integração dos picos foi feita em integrador Merck D-200.

A identificação dos esteróis foi feita por comparação com o tempo de retenção de uma mistura de padrões (brassicasterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol - Sigma). A quantificação dos esteróis totais na cera foi feita de acordo com a área do pico do padrão interno (colesterol), de concentração conhecida. Foi utilizado o fator de resposta de 0,97, estabelecido pela equipe

SMANA (*Science de Matériaux Alimentaires et Non Alimentaires*) do CIRAD-AMIS, para essa condição de análise.

### 3.2.6. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), consistindo em uma bomba com gradiente de eluição (P 1000 XR Thermo separation products, Spectra System), um injetor automático (AS 1000 Thermo separation products, Spectra System), duplo sistema de detecção, com detector de arranjo de diodos (UV 6000 LP Spectra System) e de fluorescência (FL 3000 Spectra System) e uma interface para a detecção simultânea UV-fluorescência (SN 4000, Spectra System). A separação dos HPAs foi feita em uma coluna experimental (CIL Cluzeau, 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), contendo a fase estacionária tetracloroftalimidopropil (TCP) (Figura 4). O aplicativo PC 1000 foi utilizado para análise dos dados.

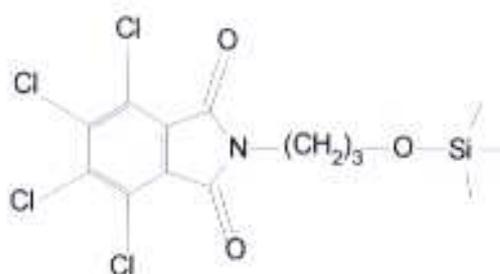


Figura 4. Estrutura química da fase estacionária TCP (Tetracloroftalimidopropil)

As análises foram feitas diretamente em amostras diluídas em hexano. Soluções (5 - 10 mg.mL<sup>-1</sup>) foram preparadas sob aquecimento e filtradas duas vezes em membrana (Millipore Millex FH 0,45 µm) antes das análises, que foram feitas em triplicata. As seguintes condições foram utilizadas: fluxo de 1,13 mL.min<sup>-1</sup> volume de injeção de 20 µL (“loop”); detector de fluorescência com excitação a 250 nm e emissão a 400 nm; detector UV a 210 nm e 290 nm.

A fase móvel utilizada foi uma mistura de 3 solventes: n-hexano, MTBE (metil tercio butil éter) e diclorometano, seguindo o gradiente apresentado a seguir (Tabela 4). O tempo total da análise de cada amostra foi de 90 min.

Tabela 4. Gradiente de eluição para separação de HPA

| Tempo (min) | n-hexano (%) | MTBE (%) | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (%) |
|-------------|--------------|----------|-------------------------------------|
| 0           | 75           | 25       | 0                                   |
| 17          | 100          | 0        | 0                                   |
| 47          | 0            | 0        | 100                                 |
| 70          | 0            | 0        | 100                                 |
| 71          | 75           | 25       | 0                                   |

A identificação dos picos foi feita por comparação com o tempo de retenção de padrões analisados nas mesmas condições (naftaleno, metil naftaleno, antraceno, fluoranteno, criseno, metil criseno, benzo-*a*-pireno - Chemservice West Chester). O método de padronização externa foi empregado para a quantificação do fluoranteno, o principal HPA presente nas amostras. Uma curva analítica com cinco concentrações diferentes de fluoranteno (0,1 a 0,7 ng.mL<sup>-1</sup>) foi obtida através de análise de regressão. A concentração do analito na

amostra foi calculada a partir da equação da reta da regressão em função da área dos picos.

### **3.3. Procedimento experimental**

#### **3.3.1. Seleção do solvente de extração**

As tortas de filtro foram moídas manualmente em almofariz para redução do número de partículas grosseiras e, após secagem em estufa, submetidas à extração em extrator tipo Butt durante o período de 8 horas. Os seguintes solventes foram avaliados: n-hexano, ciclo-hexano, isopropanol e etanol. O rendimento do extrato obtido, uma mistura de cera, triglicerídios e outros compostos, foi determinado gravimetricamente.

Foi utilizado o método descrito por LIU et al. (1996), com algumas adaptações, para a determinação da porcentagem de cera precipitada nos extratos. Os extratos (2 g) foram solubilizados a quente com n-hexano, mantendo-se a relação extrato:solvente de 1:20 (p/v). As soluções foram resfriadas a 10°C e mantidas a esta temperatura por 16 horas para a precipitação das ceras. Foi feita uma filtração e lavagem do material retido no papel de filtro com porções de 10 mL de hexano a 10°C (4 vezes) e acetona (4 vezes). As amostras retidas no papel de filtro foram secas em estufa a 65°C e o teor de cera precipitada nos extratos foi determinado gravimetricamente. A seleção do solvente utilizado na extração de cera de cana-de-açúcar em escala piloto foi baseada no rendimento em cera precipitada.

### 3.3.2. Extração e purificação da cera de cana-de-açúcar

Foi feita a extração com o solvente selecionado em extrator tipo Soxhlet, marca NGW-multi-Purpose, com capacidade para 5 L de solvente. Foram realizadas extrações com parcelas de 500 g de torta de filtro seca em estufa, durante o período de 8 horas (equivalente a 5 ciclos de refluxo). Após a extração, o solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotativo e recuperado para utilização nas extrações subseqüentes. As amostras de cera bruta obtidas (procedentes de torta de filtração de cana orgânica e de cana queimada) foram secas em estufa para eliminação do solvente residual e armazenadas a -18°C até o início das análises de caracterização e dos ensaios de purificação.

O processo de purificação aplicado às ceras brutas de cana-de-açúcar extraídas em escala piloto envolveu as etapas descritas a seguir. Cera bruta de cana-de-açúcar foi homogeneizada com n-hexano (20:1 v/p) a quente. A solução obtida foi resfriada à temperatura ambiente e posteriormente a 10°C, mantida a esta temperatura durante 1 hora e centrifugada (10 min, 5000 rpm). O precipitado foi lavado com acetona (2:1 v/p) a 10°C e a fração de cera precipitada foi separada por filtração sob vácuo leve (0,8 atm). A amostra foi seca em estufa com circulação de ar (60-65°C, 1 hora) e o rendimento foi determinado gravimetricamente. As amostras obtidas, denominadas “cera purificada de cana-de-açúcar”, foram armazenadas em congelador (-18°C) até a realização das análises de caracterização.

### 3.3.3. Caracterização das ceras obtidas

As ceras brutas de cana-de-açúcar extraídas em escala piloto e as ceras purificadas foram caracterizadas e comparadas às ceras comerciais de abelha e carnaúba. Também foram determinados a composição em álcoois e ácidos

graxos, o teor de esteróis, o teor de HPAs e o teor de tocoferóis das amostras. A avaliação do comportamento térmico das amostras foi feita por DSC.

### 3.3.4. Otimização da extração de cera de cana-de-açúcar

Após a seleção do solvente (n-hexano), foram realizados os ensaios de extração para otimização do processo em escala laboratorial com torta de filtração da cana orgânica. Em um balão de fundo redondo de 1 L de capacidade, adaptado a um condensador e com agitação magnética, foram colocadas 30 g da torta de filtro e a quantidade selecionada de n-hexano, de acordo com o delineamento experimental. A temperatura do banho foi mantida a 65°C com auxílio de um termômetro de contato. A agitação foi mantida constante em 150 rpm. Após o período determinado a mistura foi filtrada sob vácuo e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo para determinação do teor de cera bruta (p/p).

O rendimento relativo da extração em cada ensaio foi calculado com base no teor de cera bruta da torta de filtro (determinado pela extração em extrator tipo Butt) segundo a fórmula:

$$R (\%) = t / T \times 100$$

onde: R (%) = rendimento relativo da extração

t = teor de cera bruta (%) obtida em cada ensaio (p/p)

T = teor de cera bruta (%) na torta de filtração (p/p)

Foi aplicado um planejamento experimental fatorial completo, do tipo composto rotacional central, envolvendo 3 variáveis independentes (relação solvente:matéria-prima, tempo e tamanho de partículas da torta de filtração).

A torta de filtro utilizada nos ensaios foi seca em estufa. As amostras de torta foram preparadas através de trituração em moinho de facas e passagem por

peneiras para a obtenção de lotes com partículas de tamanho máximo de 1,5 mm a 4,5 mm. A Tabela 5 apresenta os níveis das variáveis independentes, compreendendo os pontos inferior (-1), superior (+1) e axiais (+ $\alpha$  e - $\alpha$ ).

O delineamento experimental aplicado é apresentado na Tabela 6. Os ensaios foram efetuados em ordem aleatória, segundo o procedimento determinado por BARROS NETO et al. (1996).

Tabela 5. Faixas de estudo das variáveis independentes em análise no processo de extração de cera de cana-de-açúcar

| Variável independente        | Nível de variação |     |      |      |       |
|------------------------------|-------------------|-----|------|------|-------|
|                              | -1,68             | -1  | 0    | +1   | +1,68 |
| Solvente:matéria-prima (v:p) | 5:1               | 7:1 | 10:1 | 13:1 | 15:1  |
| Tempo (horas)                | 1                 | 2   | 3,5  | 5    | 6     |
| Tamanho de partícula (mm)    | 1,5               | 2,0 | 3,0  | 4,0  | 4,5   |

A otimização do processo foi feita pelo método de superfície de resposta e análise de regressão múltipla, com o objetivo de definir as condições de maior rendimento em cera através do ajuste de modelo matemático de segunda ordem, incluindo termos lineares, quadráticos e as interações entre as variáveis independentes. O modelo obtido foi avaliado com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e no teste F (KHURI & CORNELL, 1987). O coeficiente de determinação é uma medida da proporção da variação total da resposta explicada pelo modelo. O teste F, que testa a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo, foi realizado por meio da análise de variância com auxílio do aplicativo “Statistica 5.0” e comparado ao valor da tabela de 95% de probabilidade para uma distribuição de referência. A validação do modelo estatístico obtido foi efetuada

através da reprodução do experimento em duas condições estabelecidas e comparando-se os resultados obtidos experimentalmente com aqueles calculados a partir do modelo matemático proposto.

Tabela 6. Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo  $2^3$  (valores codificados) aplicado à otimização do processo de extração de cera de cana-de-açúcar com n-hexano

| Ensaio | variáveis independentes       |               |                           |
|--------|-------------------------------|---------------|---------------------------|
|        | solvente:matéria- prima (v:p) | tempo (horas) | tamanho de partícula (mm) |
| 1      | -1                            | -1            | -1                        |
| 2      | +1                            | -1            | -1                        |
| 3      | -1                            | +1            | -1                        |
| 4      | +1                            | +1            | -1                        |
| 5      | -1                            | -1            | +1                        |
| 6      | +1                            | -1            | +1                        |
| 7      | -1                            | +1            | +1                        |
| 8      | +1                            | +1            | +1                        |
| 9      | -1,68                         | 0             | 0                         |
| 10     | +1,68                         | 0             | 0                         |
| 11     | 0                             | -1,68         | 0                         |
| 12     | 0                             | +1,68         | 0                         |
| 13     | 0                             | 0             | -1,68                     |
| 14     | 0                             | 0             | +1,68                     |
| 15     | 0                             | 0             | 0                         |
| 16     | 0                             | 0             | 0                         |
| 17     | 0                             | 0             | 0                         |

### 3.3.5. Estudo do processo de purificação

Os ensaios de purificação (cristalização fracionada) foram conduzidos em escala laboratorial com amostras de cera bruta de cana orgânica. Amostras de 10 g de cera bruta foram fundidas a 80°C e dissolvidas em n-hexano sob refluxo, obedecendo a relação cera bruta:solvente de 1:20 (p/v). A miscela foi mantida a 40°C até o início de cada ensaio para manter a cera bruta em solução.

Para o estudo do processo foi utilizado um recipiente de vidro com diâmetro interno de 6,0 cm e altura de 8,0 cm. A velocidade de agitação foi mantida constante a 20 rpm por meio de agitador mecânico com impulsor de placas planas (Ika-Werk). A distância entre a extremidade da pá do agitador e a parede do recipiente foi de 0,5 cm. O resfriamento controlado do sistema foi feito através da imersão do recipiente em um banho termostatizado (Lauda modelo RC 20) acoplado a um programador de temperatura (Lauda modelo PM 351). A temperatura na miscela foi acompanhada através de um termômetro. Após atingir a temperatura de cristalização desejada, estabelecida no delineamento experimental (Tabela 8), o sistema foi mantido nessa temperatura durante 60 minutos para crescimento dos cristais.

Os cristais formados foram filtrados a vácuo em um sistema composto de um kitassato de 500 mL de capacidade, acoplado a um funil de Buechner (10 cm de diâmetro, com papel de filtro Whatman nº 1) e conectado a uma trompa de vácuo (0,8 atm). O sistema todo foi mantido sob refrigeração (10°C) antes da filtração. As frações retidas nos filtros, após lavagem com acetona (1:2 p/v, 10°C) foram aquecidas em estufa com circulação de ar (60-65°C) para eliminação do solvente residual. O rendimento de cada ensaio foi determinado gravimetricamente. O fluxograma do processo de purificação está apresentado na Figura 5.

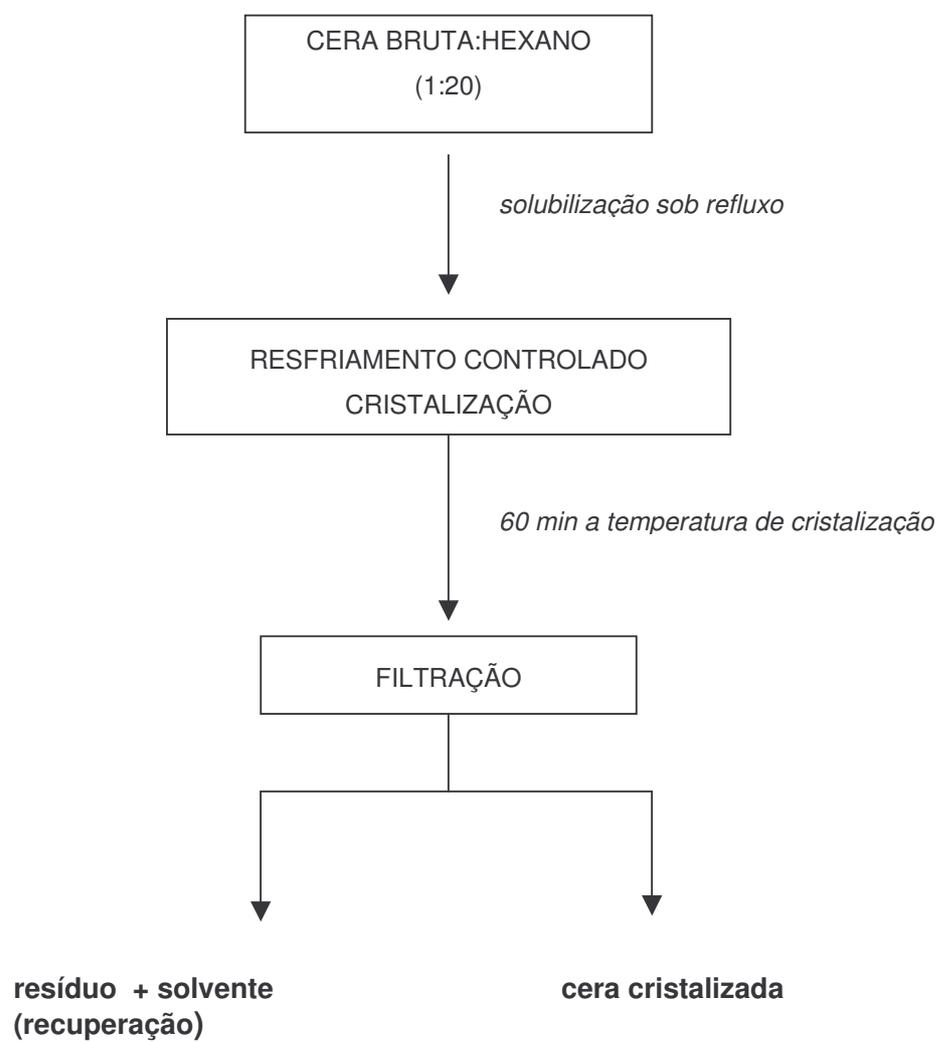


Figura 5. Fluxograma do processo de purificação cera de cana-de-açúcar com hexano

Foi aplicado um planejamento experimental fatorial completo, do tipo composto rotacional central, envolvendo 2 variáveis independentes (temperatura de cristalização - °C, e taxa de resfriamento - °C.min<sup>-1</sup>). A Tabela 7 apresenta os níveis das variáveis independentes, compreendendo o ponto inferior (-1), superior (+1) e axiais (+ $\alpha$  e - $\alpha$ ).

O delineamento experimental aplicado é apresentado na Tabela 8. O estudo do processo foi feito pelo método de superfície de resposta e análise de regressão múltipla, com o objetivo de avaliar o efeito de cada variável sobre o rendimento e propriedades térmicas dos produtos obtidos, avaliadas pela análise de DSC em duplicata (conforme descrito no item 3.2).

Os ensaios foram efetuados em ordem aleatória, segundo o procedimento determinado por BARROS NETO et al. (1996). O aplicativo “Statistica 5.0” foi utilizado para o tratamento dos dados.

Tabela 7. Faixas de estudo das variáveis independentes em análise no estudo do processo de purificação de cera de cana-de-açúcar

| Variável independente                        | Nível de variação |     |     |     |       |
|--|-------------------|-----|-----|-----|-------|
|  | -1,41             | -1  | 0   | +1  | +1,41 |
| Temperatura de cristalização (°C)            | 3                 | 5   | 10  | 15  | 17    |
| Taxa de resfriamento (°C min <sup>-1</sup> ) | 0,1               | 0,3 | 0,8 | 1,3 | 1,5   |

Tabela 8. Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo  $2^2$  (valores codificados) aplicado no estudo do processo de purificação da cera de cana-de-açúcar

| Ensaio | variáveis independentes           |  |
|--------|-----------------------------------|--|
|        | Temperatura de cristalização (°C) | Taxa de resfriamento (°C min <sup>-1</sup> ) |
| 1      | -1                                | -1   |
| 2      | +1                                | -1   |
| 3      | -1                                | +1   |
| 4      | +1                                | +1   |
| 5      | -1,41                             | 0  |
| 6      | +1,41                             | 0  |
| 7      | 0                                 | -1,41  |
| 8      | 0                                 | +1,41  |
| 9      | 0                                 | 0  |
| 10     | 0                                 | 0  |
| 11     | 0                                 | 0  |

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização da torta de filtro

As tortas de filtro moídas em moinho de facas, secas e passadas por peneira (ASTM E 11-81, 0,425 mm) foram submetidas à extração com n-hexano durante um período de 16 horas em extrator tipo Butt. A torta de filtração da cana orgânica apresentou um teor maior de cera bruta. A Tabela 9 apresenta os valores de umidade e teor de lipídios (base seca) das matérias-primas analisadas.

Tabela 9. Umidade e teor de lipídios (base seca) de tortas de filtro de cana-de-açúcar

|                | Umidade <sup>a</sup> | Desvio padrão | Teor de lipídios <sup>b</sup> | Desvio padrão |
|----------------|----------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| torta orgânica | 8,60%                | 0,120         | 7,30%                         | 0,049         |
| torta queimada | 4,03%                | 0,052         | 5,29%                         | 0,040         |

<sup>a</sup> média de 5 repetições    <sup>b</sup> média de 6 repetições

### 4.2. Seleção do solvente de extração de cera

A Tabela 10 apresenta o rendimento (p/p, base seca) da extração de cera de tortas de filtro com diferentes solventes. Os valores obtidos variaram de 4,23% a 15,29%, dependendo do tipo de torta e do solvente utilizado.

Tabela 10. Rendimento (%) da extração de tortas de filtro de cana-de-açúcar com diferentes solventes

| Solvente    | cana orgânica | Desvio padrão | cana queimada | Desvio padrão |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| n-hexano    | 7,11          | 0,096         | 4,32          | 0,107         |
| ciclohexano | 7,51          | 0,021         | 4,36          | 0,108         |
| Isopropanol | 12,25         | 0,810         | 15,29         | 0,866         |
| etanol      | 12,09         | 0,164         | 12,26         | 1,639         |

média de 4 repetições

A torta de filtração da cana queimada extraída com n-hexano ou ciclohexano apresentou rendimentos menores em comparação com a cana orgânica. No entanto, quando se utilizou isopropanol ou etanol, o rendimento da extração não sofreu variação da mesma maneira. O rendimento da extração da torta de filtração da cana queimada foi igual e até maior em comparação com os valores obtidos a partir de torta de cana orgânica com emprego do etanol ou isopropanol. Isso indica que outros compostos mais polares são extraídos por esses solventes, dado que concorda com os resultados obtidos por BUTTAR et al. (1999), que verificaram que o aumento da polaridade do solvente de extração contribuiu para um maior rendimento em cera bruta. Os autores obtiveram rendimentos de cerca de 7% utilizando solventes apolares como hexano, tolueno ou clorofórmio e de cerca de 20% utilizando etanol.

A variação entre os resultados de rendimento da extração de tortas de filtro de cana queimada e orgânica pode estar associada a vários fatores, como diferenças entre as variedades de cana cultivada e diferenças no processo de industrialização da cana. A cana-de-açúcar que sofre processo que queima geralmente apresenta maior teor de impurezas, o que também poderia explicar o menor rendimento da extração observado com uso de n-hexano e ciclohexano.

O extrato de torta de filtro de cana queimada obtido com n-hexano apresentou coloração marrom clara levemente esverdeada, sendo o extrato obtido a partir de torta de cana orgânica de coloração verde mais acentuada. Os extratos obtidos com ciclohexano apresentaram coloração verde intensa. Os obtidos com isopropanol, bem como aqueles extraídos com etanol, apresentaram cor verde muito escura e aparência heterogênea, com presença de partículas de aspecto resinoso.

Os extratos obtidos foram solubilizados a quente com n-hexano para a determinação do teor de cera precipitada, conforme o método adaptado de LIU et al. (1996). Os extratos isopropílicos e etanólicos foram submetidos à etapa de filtração após a solubilização para a remoção das partículas insolúveis em hexano. Após o resfriamento, as soluções foram filtradas e as ceras precipitadas lavadas com porções de hexano e acetona, seguido de secagem em estufa a 65°C. O teor de cera precipitada nas tortas de filtro, obtido a partir da relação entre o teor de cera precipitada nos extratos e o rendimento das extrações, é apresentado na Tabela 11.

Tabela 11. Teor de cera precipitada (%) nas de tortas de filtro de cana-de-açúcar extraídas com diferentes solventes

| Solvente    | cana orgânica | cana queimada |
|-------------|---------------|---------------|
| n-hexano    | 4,07          | 2,15          |
| ciclohexano | 4,23          | 2,16          |
| isopropanol | 2,06          | 1,70          |
| etanol      | 1,95          | 1,59          |

média de 3 repetições

As ceras precipitadas obtidas a partir dos extratos de n-hexano apresentaram uma coloração branco-amarelada e aspecto bastante uniforme. As ceras precipitadas obtidas a partir de ciclohexano apresentaram uma coloração clara, porém esverdeada, enquanto que aquelas provenientes da extração com isopropanol ou etanol exibiram uma cor mais escura. A quantidade de cera obtida por precipitação foi menor quando se utilizou o isopropanol ou o etanol na extração, indicando a presença de materiais não lipídicos solúveis em álcool nos extratos. De fato, BUTTAR et al. (1999) verificaram que o uso do metanol na extração influenciou drasticamente a qualidade da cera bruta obtida, que apresentou índice de acidez de  $67,32 \text{ mg KOH.g}^{-1}$  em comparação com o valor de  $37,4 \text{ mg KOH.g}^{-1}$  da cera extraída com hexano. Os autores também relacionaram o uso do solvente polar à extração de impurezas.

Verificou-se que o rendimento em cera precipitada obtido com a utilização do n-hexano ou do ciclohexano na extração foi muito superior aos rendimentos obtidos a partir da extração com isopropanol ou etanol. No entanto, a cera bruta de cana orgânica extraída com ciclohexano apresentou coloração verde muito intensa. AZZAM (1984), extraiu cera de cana-de-açúcar com álcool e obteve um extrato de cor verde muito escuro, devido à presença de clorofila, de difícil remoção mesmo após o branqueamento com dióxido de enxofre. A Tabela 12 apresenta o teor de clorofila das ceras extraídas com esses dois solventes.

O n-hexano foi selecionado como solvente de extração por apresentar o mesmo rendimento de extração que o ciclohexano, sem o inconveniente da forte coloração verde da cera. Considerando a obtenção, em média, de 30 kg de torta de filtro por tonelada de cana-de-açúcar (SERRA, 2003<sup>5</sup>), pode-se concluir que a extração de cera das amostras estudadas com hexano proporcionaria rendimentos entre 1,30 e 2,13 kg de cera bruta para cada tonelada de cana.

---

<sup>5</sup> SERRA, G. E. Comunicação pessoal, 2003.

Tabela 12. Teor de clorofila ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) em ceras de cana-de-açúcar

| Solvente    | cana queimada | desvio padrão | cana orgânica | desvio padrão |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| ciclohexano | 21,78         | 0,064         | 299,53        | 3,465         |
| n-hexano    | 13,91         | 0,897         | 202,03        | 4,341         |

cada valor é a média de 5 repetições

### 4.3. Extração e purificação das ceras

As extrações utilizando n-hexano como solvente foram realizadas com porções de 500 g de tortas de filtro secas, de cana orgânica e de cana queimada. Cada ensaio permitiu a obtenção de cerca de 32 g de cera bruta de cana orgânica e 20 g de cera bruta de cana queimada. Foram realizadas várias extrações de um único lote de torta, as amostras resultantes foram homogeneizadas e utilizadas nas análises de caracterização.

A cera bruta de cana queimada apresentou coloração marrom clara. A cera purificada de cana queimada obtida por precipitação em hexano apresentou coloração esbranquiçada e aspecto quebradiço. O rendimento do processo de purificação foi de 57% ( $\pm 1\%$ ) em cera purificada. A cera bruta de cana orgânica apresentou coloração verde e a cera purificada, uma coloração ligeiramente esverdeada, mas muito clara. O rendimento do processo de purificação foi de 60% ( $\pm 0,5\%$ ).

O resíduo da extração, após a evaporação do solvente residual, poderia ser utilizado como adubo. GONÇALVES (1998) analisou os extratos minerais de tortas de filtração da cana-de-açúcar antes e depois da extração da fração lipídica pelo método de Bligh & Dyer. Os macro e micronutrientes inicialmente presentes nas tortas permaneceram, em maior proporção, na torta extraída, com a vantagem de se tornarem mais disponíveis no solo na ausência de lipídios.

#### 4.4. Caracterização das ceras obtidas

Os resultados da análise das ceras comerciais de abelha e carnaúba, das ceras brutas de cana extraídas em escala piloto com n-hexano e das ceras purificadas de cana são apresentados na Tabela 13.

Os valores observados para as ceras de carnaúba e abelha concordam com os aqueles encontrados na literatura. Os valores de índice de acidez e índice de saponificação apresentados pelas ceras brutas de cana concordam com alguns dos dados da literatura. BUTTAR et al. (1999), encontraram valores de índice de acidez variando de 29,0 a 37,4 mg KOH.g<sup>-1</sup> em amostras de cera bruta de cana extraídas com solventes apolares como hexano, tolueno e clorofórmio. O índice de saponificação dessas mesmas amostras variou de 109,4 a 115,3 mg KOH.g<sup>-1</sup>.

AZZAM (1986) analisou cera egípcia de cana-de-açúcar e encontrou valores de índice de saponificação variando de 66,20 a 130,70 mg KOH.g<sup>-1</sup>, dependendo do solvente de extração utilizado. Entretanto, LARIOS et al. (1993) apresentaram valores de índice de saponificação muito mais altos, variando de 448,8 a 732,1 mg KOH.g<sup>-1</sup>. Os autores, que efetuaram a extração da cera com clorofórmio, associaram os resultados à presença de uma fração resinosa na cera de cana-de-açúcar.

Quanto aos outros índices analíticos, a análise dos resultados indica que as ceras brutas de cana-de-açúcar são mais insaturadas que as ceras de abelha e carnaúba, pois apresentaram maiores valores de índice de iodo. O teor de clorofila da cera bruta de cana orgânica pode ser associado à coloração verde da amostra. A cera bruta extraída da cana queimada apresentou um teor de clorofila abaixo do limite de detecção do método, o que indica que a clorofila original deve ter sido convertida em outros compostos durante o processo de extração da cera em escala piloto. As ceras brutas de cana-de-açúcar apresentaram alto teor de fósforo, independentemente da origem da torta de filtração.

Tabela 13. Características de ceras de cana-de-açúcar e ceras comerciais de abelha e carnaúba.

| Parâmetro   | cera bruta de cana |                | cera purificada de cana |               | ceras comerciais |               |
|---|--------------------|----------------|-------------------------|---------------|------------------|---------------|
|   | orgânica           | queimada       | orgânica                | queimada      | carnaúba         | abelha        |
| Índice de Acidez<br>(mg KOH.g <sup>-1</sup> )       | 52,36 (1,605)      | 44,52 (1,011)  | 20,54 (0,894)           | 17,23 (1,521) | 13,09 (0,481)    | 22,28 (0,396) |
| Índice de Saponificação<br>(mgKOH.g <sup>-1</sup> ) | 123,54 (3,571)     | 119,69 (1,888) | 77,85 (1,897)           | 76,50 (1,310) | 75,32 (2,261)    | 75,60 (0,710) |
| Índice de Iodo – Wijs<br>(mg I.100g <sup>-1</sup> ) | 22,91 (2,332)      | 20,54 (0,343)  | 12,56 (0,870)           | 10,20 (0,748) | 10,35 (0,760)    | 6,53 (0,271)  |
| Matéria insaponificável<br>(%)                      | 35,49 (1,587)      | 36,10 (1,136)  | 55,60 (1,890)           | 57,40 (1,920) | 54,80 (2,456)    | 53,23 (1,810) |
| Fósforo (830 nm)<br>(mg.kg <sup>-1</sup> )          | 482,07 (0,495)     | 494,92 (0,675) | 10,71 (0,654)           | 9,87 (0,984)  | 6,55 (0,785)     | ND            |
| Tocoferol (α-tocoferol)<br>(mg.kg <sup>-1</sup> )   | 155,16 (1,657)     | 149,15 (5,163) | ND                      | ND            | 16,54 (0,356)    | ND            |
| Clorofila<br>(mg.kg <sup>-1</sup> )                 | 198,51 (3,502)     | ND             | ND                      | ND            | ND               | ND            |

cada valor é a média de 5 repetições, desvio padrão apresentado entre parênteses

ND = não detectado pelo método utilizado

As ceras de abelha e carnaúba apresentaram mais de 50% de matéria insaponificável, pois os álcoois graxos livres e esterificados com ácidos graxos constituem material que não é saponificado com álcali. As ceras brutas de cana de açúcar apresentaram um teor percentualmente mais baixo de matéria insaponificável, provavelmente devido à presença de uma fração triglicéridica. No entanto, as ceras purificadas de cana apresentaram uma porcentagem maior de matéria insaponificável. Isso indica que o processo utilizado foi eficiente em concentrar a fração de ésteres de cera das amostras.

Analisando-se a Tabela 13, também pode-se observar que o índice de acidez sofreu um considerável decréscimo como resultado do processo de purificação das ceras brutas de cana. O índice de iodo sofreu uma redução, indicando que possivelmente a fração mais insaturada das amostras pode ter sido separada juntamente com os triglicéridios e ácidos graxos livres presentes nas ceras brutas. Da mesma maneira, os teores de fósforo e de clorofila sofreram decréscimos. As ceras purificadas obtidas apresentaram índices analíticos comparáveis aos das ceras comerciais de abelha e carnaúba.

#### **4.5. Composição em álcoois e ácidos graxos**

O processo de derivatização das amostras com o reagente de Grignard foi acompanhado através de análise de cromatografia em camada delgada (CCD) para a visualização da hidrólise dos ésteres de cera conforme exemplificado na Figura 6.

A reação durante 40 min à temperatura ambiente promoveu a conversão dos ésteres em álcoois primários e terciários em todas as amostras analisadas. As análises por CCD mostraram que as amostras derivatizadas apresentaram bandas escuras relativas aos álcoois primários, álcoois terciários e hidrocarbonetos (que não são alterados pela reação com o reagente de Grignard), enquanto que as

bandas originais referentes aos ésteres de cera e triglicerídios não foram observadas após a reação.

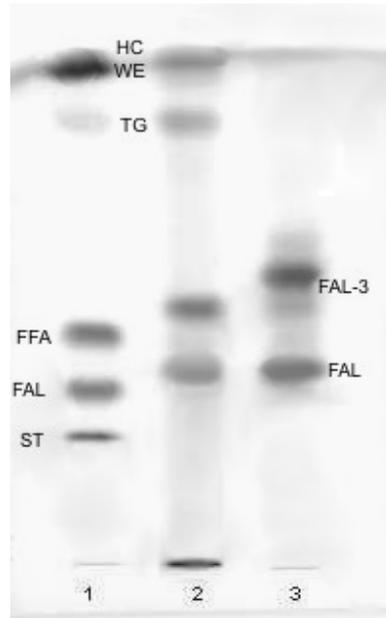


Figura 6. Acompanhamento da derivatização de amostra de cera com reagente de Grignard. 1: padrões, 2: cera bruta de cana queimada, 3: cera bruta de cana queimada após a derivatização. ST: esteroi, FAL: álcool primário, FFA: ácido graxo livre, FAL-3: álcool terciário, TG: triglicerídio, WE: éster de cera, HC: hidrocarboneto. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ac. acético (60:40:0,5)

#### 4.5.1. Composição em álcoois graxos

As amostras de cera analisadas apresentaram álcoois graxos saturados de 24 a 34 carbonos, sendo que o principal componente nas ceras brutas e purificadas de cana-de-açúcar foi o octacosanol ( $C_{28}H_{57}OH$ ).

Álcoois graxos de 26 a 32 carbonos normalmente estão presentes em ceras epicuticulares de várias plantas (TULLOCH, 1974; BENNET, 1956) e no sedimento formado em óleos de canola e girassol (PRZYBYLSKI et al., 1993). A Tabela 14 apresenta a composição em álcoois graxos das amostras analisadas (proporção relativa dos álcoois graxos livres e esterificados).

Os resultados mostraram que não houve diferença considerável entre a composição dos dois tipos de cera de cana-de-açúcar (orgânica e queimada). Nas duas amostras, o octacosanol contribuiu com mais de 60% do total de álcoois graxos. No entanto, a cera bruta de cana orgânica apresentou maior proporção de álcoois graxos de cadeias mais longas (triacontanol -  $C_{30}H_{61}OH$  e dotriacontanol -  $C_{32}H_{61}OH$ ).

O processo de purificação aplicado promoveu um pequeno aumento na proporção relativa do octacosanol, verificado tanto na amostra de cera de cana orgânica quanto na amostra de cera de cana queimada. A proporção relativa deste álcool graxo aumentou em média 7,7% com o processo de purificação.

A cera comercial de carnaúba apresentou álcoois graxos de cadeia mais longa (triacontanol e dotriacontanol) em maiores proporções, enquanto que o triacontanol foi o principal componente da cera de abelha.

A Figura 7 demonstra que os álcoois graxos de até 28 carbonos compuseram 78 a 86% do total de álcoois nas amostras de cera de cana-de-açúcar, enquanto que na cera de carnaúba esta contribuição foi de cerca de 18%. A cera de abelha apresentou uma maior distribuição de álcoois graxos, com 24 a 28 carbonos.

Tabela 14. Composição em álcoois graxos de ceras de cana-de-açúcar e ceras comerciais de abelha e carnaúba

| Álcool graxo* | % de área do cromatograma |                     |                          |                          |        |          |
|---------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------|----------|
|               | cana orgânica bruta       | cana queimada bruta | cana orgânica purificada | cana queimada purificada | abelha | carnaúba |
| 18:0          | -                         | -                   | -                        | -                        | 7,04   | -        |
| 20:0          | -                         | -                   | -                        | -                        | 0,98   | tr       |
| 22:0          | -                         | -                   | -                        | -                        | -      | 3,52     |
| 24:0          | 7,81                      | 9,42                | 7,09                     | 8,04                     | 16,19  | 12,53    |
| 26:0          | 9,19                      | 10,14               | 8,90                     | 10,53                    | 12,16  | tr       |
| 28:0          | 61,54                     | 63,79               | 67,28                    | 67,70                    | 15,89  | 2,01     |
| 30:0          | 12,25                     | 8,67                | 11,06                    | 7,64                     | 27,55  | 10,32    |
| 32:0          | 6,04                      | 4,58                | 5,57                     | 3,44                     | 13,55  | 58,37    |
| 34:0          | tr                        | tr                  | tr                       | tr                       | 0,99   | 12,95    |
| NI            | 2,15                      | 2,38                | -                        | 1,64                     | 4,64   | -        |

\*álcool graxo derivado de amostras de cera e analisado como álcool primário (cada valor é a média de 2 repetições)

NI = soma dos picos não identificados tr <0,5%

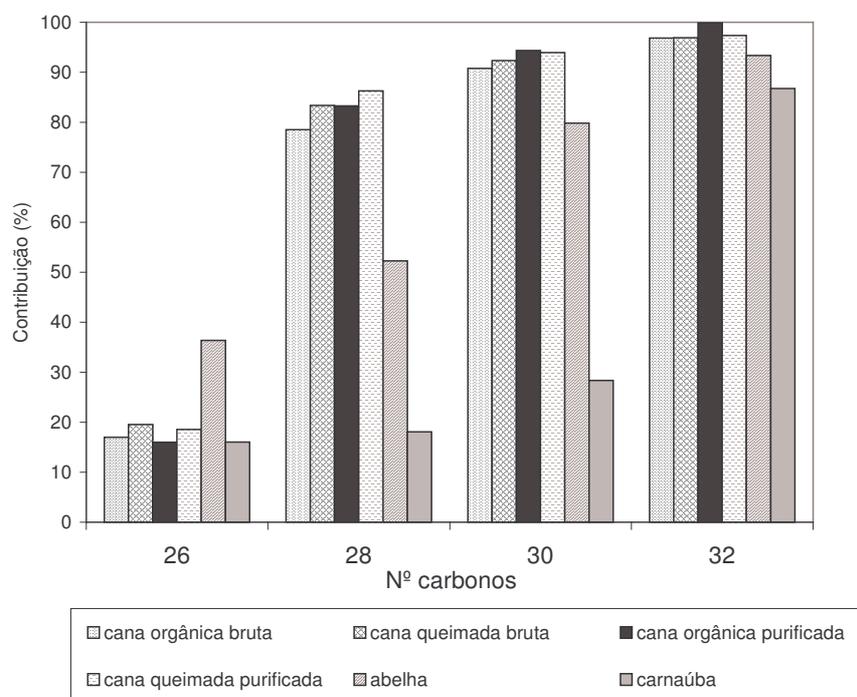


Figura 7. Comparação entre a contribuição de álcoois graxos de cadeia longa na composição de ceras. O número de carbonos significa a quantidade (%) de álcoois graxos acumulados até o tamanho da cadeia indicado

As Figuras 8 a 10 apresentam exemplos de cromatogramas com o perfil dos álcoois graxos. Dentre os álcoois de cadeia longa que apresentam potencial de aplicação farmacêutica, o octacosanol é o componente mais estudado (MAS et al., 1999; MENENDEZ et al., 1999). Por esse motivo foi determinado o teor de octacosanol nas amostras de cera de cana-de-açúcar.

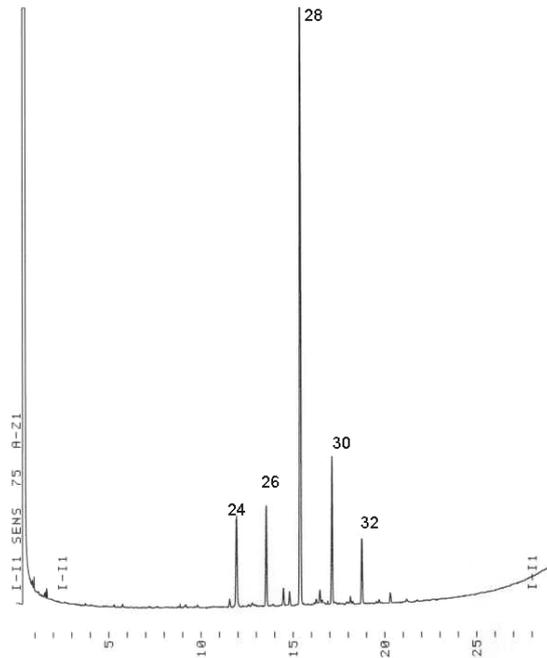


Figura 8. Cromatograma de álcoois graxos da cera bruta de cana orgânica

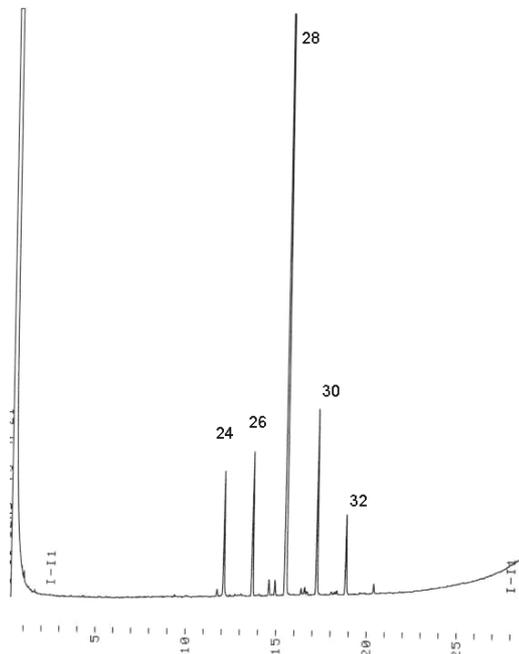


Figura 9. Cromatograma dos álcoois graxos de cera purificada de cana orgânica

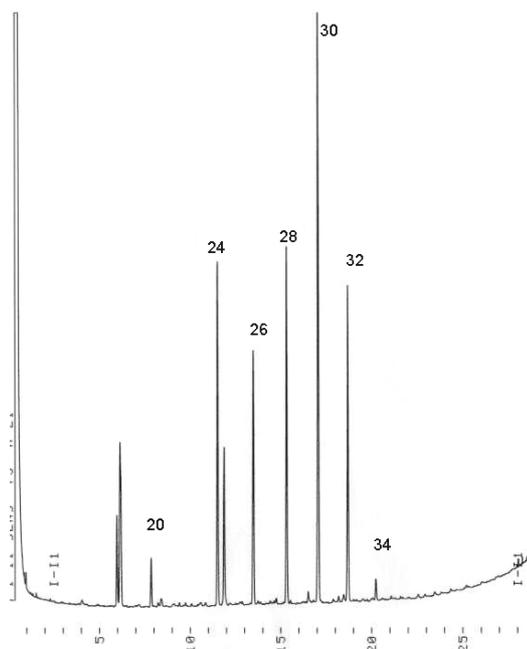


Figura 10. Cromatograma dos álcoois graxos de cera de abelha

A curva de calibração para determinação quantitativa do octacosanol nas amostras foi linear na faixa estudada, com bom coeficiente de correlação. A equação obtida, que considera a diferença da resposta do detector para cada componente, foi utilizada para o cálculo da concentração de octacosanol nas amostras. A Figura 11 apresenta a curva utilizada para a quantificação do octacosanol nas amostras de cera de cana-de-açúcar. Os valores resultantes são apresentados na Tabela 15.

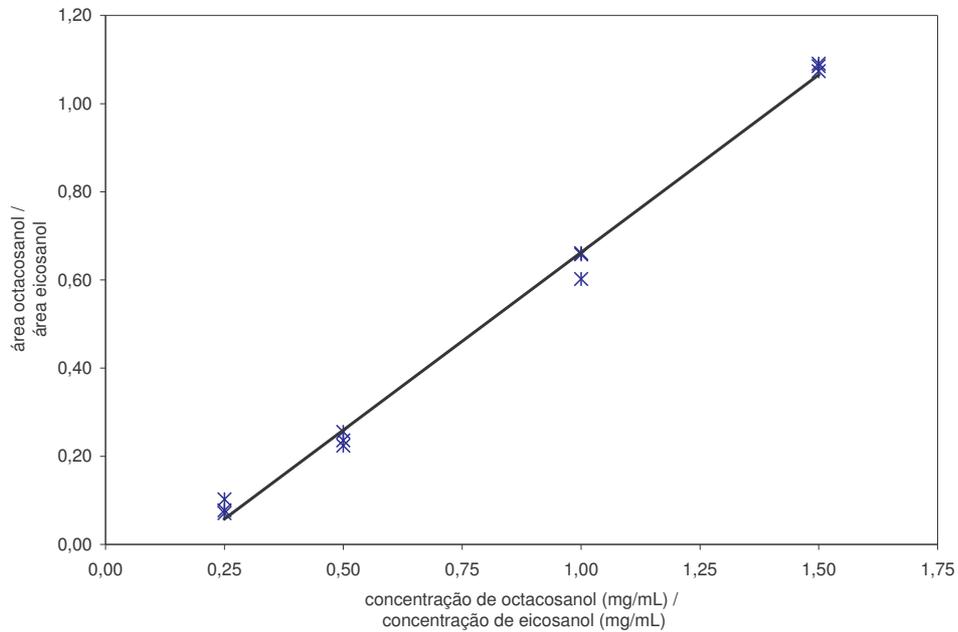


Figura 11. Curva de calibração utilizada para a quantificação do octacosanol nas amostras de cera de cana-de-açúcar. Equação:  $concentração = 1,2343 \times área + 0,1813$  ( $R^2 = 0,995$ )

Tabela 15. Teor de octacosanol em amostras de cera de cana-de-açúcar

| Amostra                         | Concentração ( $mg.g^{-1}$ )* | Desvio padrão |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------|
| cera bruta – cana orgânica      | 118,57                        | 7,30          |
| cera bruta – cana queimada      | 128,50                        | 9,66          |
| cera purificada – cana orgânica | 190,82                        | 4,23          |
| cera purificada – cana queimada | 224,89                        | 6,23          |

\*cada valor é a média de 3 repetições

Considerando-se que todos os álcoois graxos presentes nas amostras de cera de cana-de-açúcar apresentam o mesmo coeficiente de resposta ao detector, a porcentagem de álcoois graxos livres e esterificados nas ceras de cana pode ser calculada com base na porcentagem relativa de octacosanol. Assim sendo, os teores de álcoois totais das ceras brutas de cana orgânica e queimada seriam, respectivamente, 19,25% e 20,14%. As ceras purificadas de cana orgânica e queimada conteriam 28,35% e 33,20% de álcoois totais, respectivamente.

Esses valores concordam com o observado por NUISSIER et al. (2002). Os autores utilizaram o resíduo de fermentação e destilação de caldo de cana para a extração de cera com ciclohexano. A fração de cera insolúvel em metanol, acetona e isooctano foi saponificada e submetida a análise por CCD analítica para quantificação dos seus componentes. Mesmo tendo utilizado matéria-prima e procedimento de extração e purificação da cera diferentes do que foi aplicado neste trabalho, os resultados obtidos foram similares. A fração de cera analisada pelos autores apresentou 32% de álcoois graxos totais. O principal álcool graxo foi o octacosanol, representando 63% dos álcoois graxos.

#### **4.5.2. Composição em ácidos graxos**

Somente os ácidos graxos originalmente esterificados na forma de triglicerídios, ésteres de cera e ésteres de esterol (se presentes) foram convertidos em álcoois terciários, pois o método utilizado não promove a derivatização dos ácidos graxos livres, conforme elucidado por PINA et al. (1995).

Os ácidos graxos das amostras de cera de cana-de-açúcar foram principalmente os saturados de cadeia normal e longa, de 16 a 34 carbonos, com uma predominância do ácido palmítico (C16:0) e octacosanóico (C28:0), conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Composição em ácidos graxos esterificados de ceras de cana-de-açúcar e ceras comerciais

| Ácido graxo* | % de área do cromatograma |                     |                          |                          |        |          |
|--------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------|----------|
|              | cana orgânica bruta       | cana queimada bruta | cana orgânica purificada | cana queimada purificada | abelha | carnaúba |
| 14:0         | tr                        | tr                  | -                        | -                        | tr     | tr       |
| 16:0         | 30,19                     | 41,43               | 19,44                    | 22,18                    | 78,24  | 5,90     |
| 18:0         | 5,86                      | 1,97                | 2,95                     | tr                       | 7,31   | 2,45     |
| 18:1         | 7,33                      | 6,07                | 2,89                     | 2,97                     | 3,61   | tr       |
| 18:2         | 3,21                      | 3,32                | 1,27                     | 1,38                     | -      | -        |
| 20:0         | tr                        | 1,98                | tr                       | tr                       | 1,43   | 11,17    |
| 22:0         | tr                        | tr                  | tr                       | tr                       |        |          |
| 24:0         | 8,80                      | 12,94               | 19,46                    | 26,21                    | 2,98   | 14,68    |
| 26:0         | 2,06                      | 1,65                | 3,54                     | 2,85                     | 3,60   | 30,62    |
| 28:0         | 23,17                     | 19,42               | 34,65                    | 30,64                    | 1,08   | 11,76    |
| 30:0         | 6,61                      | 5,03                | 7,18                     | 7,02                     | tr     | 16,15    |
| 32:0         | 2,63                      | tr                  | 2,72                     | 1,77                     | tr     | 3,26     |
| 34:0         | 1,87                      | tr                  | 2,47                     | 1,81                     | tr     | tr       |
| NI           | 8,27                      | 6,19                | 3,43                     | 3,17                     | 1,00   | 4,01     |

\*ácido graxo derivado de amostras de cera e analisado como álcool terciário (cada valor é a média de 2 repetições)

NI = soma dos picos não identificados tr = <1,00%

GAMEZ et al. (2002) analisaram uma mistura comercial de ácidos graxos isolados de cera de cana-de-açúcar e encontraram o ácido octacosanóico como principal componente. Também encontraram os ácidos palmítico, triacontanóico (C30:0), dotriacontanóico (C32:0) e tetratriacontanóico (C34:0). Entretanto, como

se tratava de um produto comercial manipulado, as proporções relativas de cada ácido graxo não foram as mesmas observadas para as amostras de cera de cana-de-açúcar.

Somente as amostras de cera de cana apresentaram uma pequena porcentagem de ácido linoléico (C18:2). A cera de abelha, composta predominantemente pelo ácido palmítico, apresentou apenas uma pequena proporção de ácido oléico (C18:1). A cera de carnaúba apresentou somente ácidos graxos saturados, principalmente de cadeia longa. A Figura 12 ilustra a distribuição dos tamanhos de cadeia dos ácidos graxos das amostras analisadas.

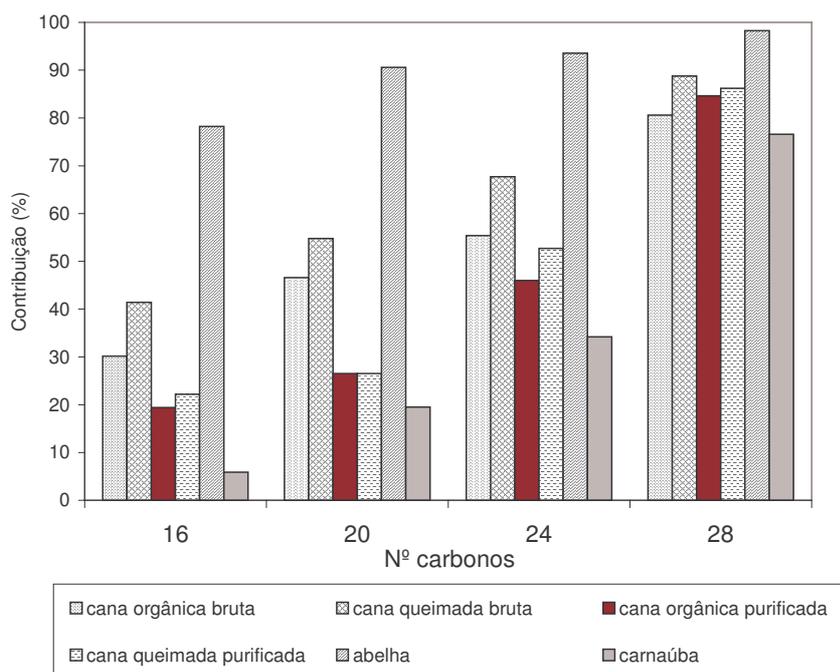


Figura 12. Comparação entre a contribuição de ácidos graxos de cadeia média e longa na composição de ceras. O número de carbonos significa a quantidade (%) de ácidos graxos acumulados até o tamanho da cadeia indicado

Da mesma maneira como foi observado para a composição em álcoois graxos, houve uma diferença pequena entre a composição das ceras de cana de origem orgânica e queimada. Porém, a alteração no perfil de ácidos graxos como resultado do processo de purificação aplicado seguiu um padrão similar nas duas amostras. O processo de purificação promoveu a concentração dos ácidos graxos de cadeia longa, de 24 a 28 carbonos, e redução na porcentagem relativa dos ácidos palmítico e oléico. Conforme ilustrado na Figura 12, os ácidos graxos de até 16 carbonos representam 30% a 41% do total de ácidos graxos nas amostras de cera bruta de cana e somente cerca de 20% nas ceras purificadas. Isso indica que os ácidos graxos de cadeia normal devem fazer parte da fração triglicéridica da cera bruta. As Figuras 13 a 15 mostram exemplos de cromatogramas com o perfil de ácidos graxos das amostras analisadas e a identificação dos picos principais.

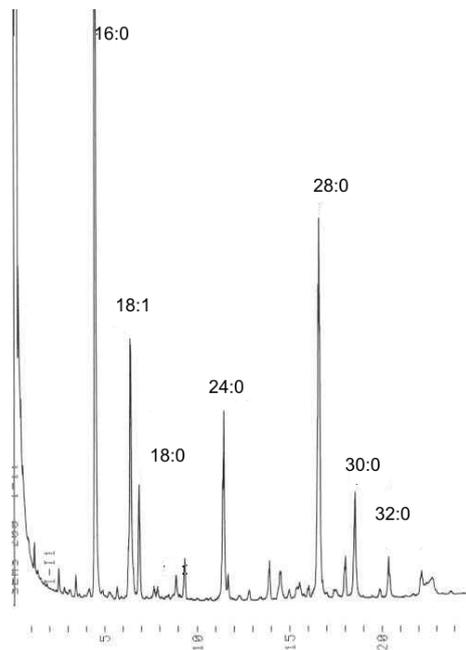


Figura 13. Cromatograma dos álcoois graxos terciários em cera bruta de cana orgânica

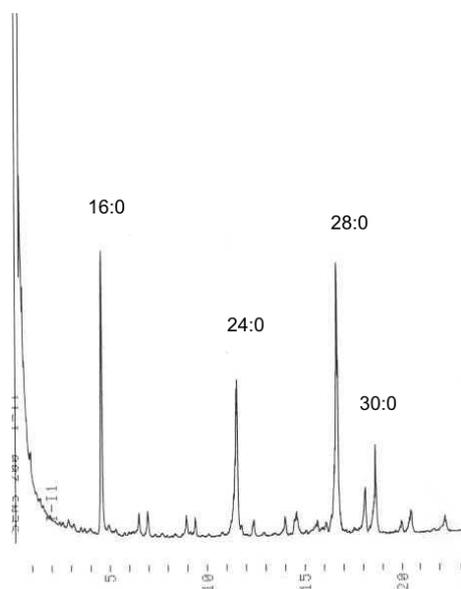


Figura 14. Cromatograma dos álcoois graxos terciários em cera purificada de cana orgânica

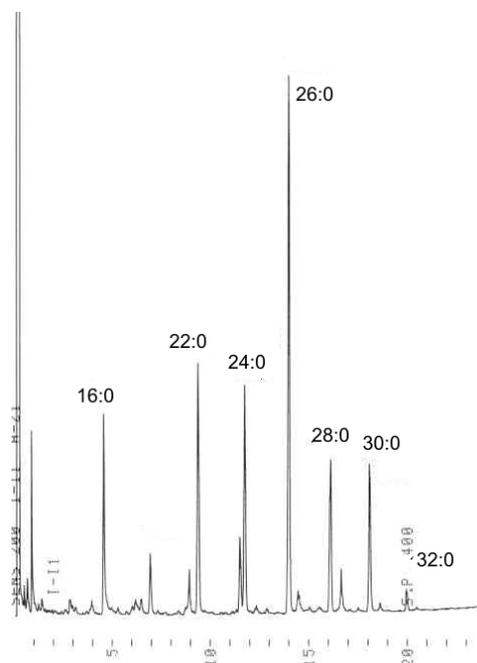


Figura 15. Cromatograma dos álcoois graxos terciários em cera de carnaúba

#### 4.6. Composição em esteróis

Para confirmar a eficácia do reagente de Grignard na conversão de ésteres de esterol em esteróis livres e álcoois graxos terciários foi conduzido um ensaio com colesteril palmitato. A reação foi acompanhada através de análises de CCD. A Figura 16 mostra os produtos identificados na placa de CCD, resultantes da derivatização do éster de esterol.

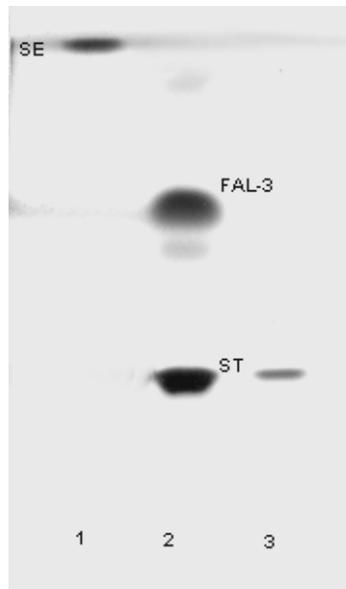


Figura 16. Acompanhamento da derivatização de éster de esterol com reagente de Grignard. 1: colesteril palmitato, 2: colesteril palmitato derivatizado, 3: colesterol. SE: éster de esterol, FAL-3: álcool terciário, ST: esterol. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (60:40:0,5)

As análises de CCD mostraram que somente as amostras de cera bruta de cana-de-açúcar orgânica apresentaram uma banda relativa aos esteróis. As amostras comerciais de ceras de abelha e carnaúba, a cera bruta de cana

queimada e as ceras purificadas de cana não apresentaram bandas relativas a esteróis quando analisadas por CCD, mesmo após a derivatização com reagente de Grignard. A Figura 17 apresenta os produtos resultantes após a derivatização da amostra de cera bruta de cana orgânica. Nota-se que após a derivatização houve o aparecimento de uma banda referente aos álcoois terciários e a banda relativa aos esteróis se mostrou mais forte. Os valores de Rf apresentados por alguns dos componentes da amostra não são exatamente os mesmos observados nos padrões, pois os ácidos e álcoois na cera de cana de açúcar apresentam cadeia mais longa do que os padrões utilizados.

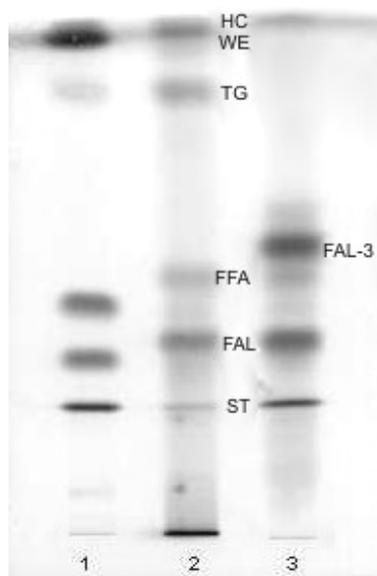


Figura 17. Acompanhamento da derivatização de cera bruta de cana orgânica com reagente de Grignard. 1: padrões, 2: cera bruta de cana orgânica, 3: cera bruta de cana orgânica após a derivatização. ST: esteroi, FAL: álcool primário, FFA: ácido graxo livre, FAL-3: álcool terciário, TG: triglicéridio, WE: éster de cera, HC: hidrocarboneto. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ac. acético (60/40/0,5)

A Figura 18 apresenta um exemplo de cromatograma com o perfil dos esteróis (livres e esterificados) presentes na cera bruta de cana orgânica. O resultado da análise de composição dos esteróis (obtidos após isolamento por CCD preparativa) por cromatografia gasosa é apresentado na Tabela 17. A cera bruta de cana orgânica apresentou  $34,0 \text{ mg.g}^{-1}$  de esteróis totais.

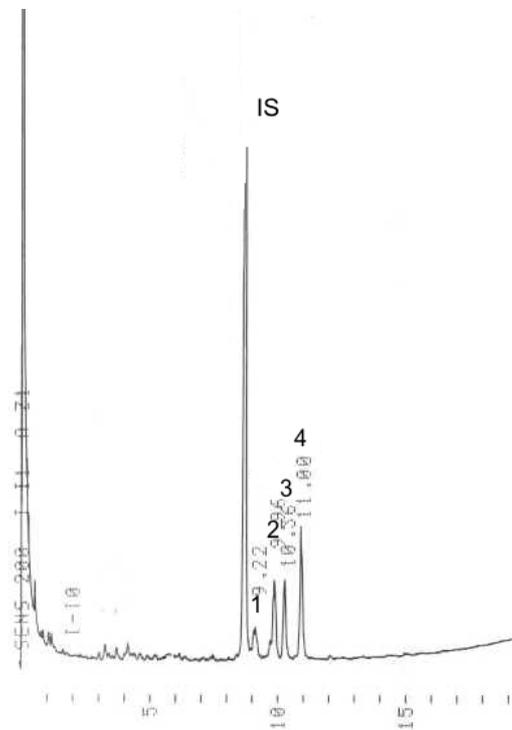


Figura 18. Cromatograma dos esteróis em cera bruta de cana orgânica (IS: padrão interno: colesterol, 1: brassicasterol, 2: campesterol, 3: estigmasterol, 4:  $\beta$ -sitosterol)

Tabela 17. Composição (% de área) e concentração de esteróis totais em cera bruta de cana orgânica.

| Esterol                                    | % de área   | Desvio padrão |
|--|-------------|---------------|
| $\beta$ -Sitosterol                        | 36,00       |               |
| Campesterol                                | 23,21       |               |
| Estigmasterol                              | 29,15       |               |
| Brassicasterol                             | 10,95       |               |
| <b>Esteróis Totais (mg.g<sup>-1</sup>)</b> | <b>34,0</b> | 1,128         |

PHUKAN & BORUAH (1999) utilizaram uma solução de carvão ativo no refino de cera de cana previamente extraída com tetracloreto de carbono e obtiveram uma cera purificada com 1,0-1,5% de ésteres de esterol. NUISSIER et al. (2002), que analisaram amostras de cera de cana obtidas de um resíduo de destilação, encontraram cerca de 1,4% de esteróis, compostos principalmente pelo  $\beta$ -sitosterol (47 - 53%), estigmasterol (23 - 31%) e campesterol (16 - 22%). As diferenças quanto à concentração de esteróis relatada pelos autores poderia ser relacionada à origem da cera, que foi obtida a partir de resíduo de destilação de cana e não de torta de filtração. No entanto, a proporção relativa de cada um dos esteróis aproxima-se dos valores observados por NUISSIER et al. (2002).

Como a cera purificada de cana orgânica não apresentou a banda relativa aos esteróis, mesmo após a derivatização com reagente e Grignard, pode-se supor que os esteróis presentes na amostra de cera bruta de cana orgânica estão concentrados na fração mole da cera. Os esteróis constituem uma matéria-prima de grande aplicação nas indústrias alimentícia (como ingrediente funcional) e farmacêutica. SCAVARIELLO (2002) estudou a viabilidade técnica da recuperação dos esteróis de borra de neutralização de óleo de arroz, contendo 2,03% de esteróis totais, o que tornaria viável o estudo da recuperação neste caso.

#### 4.7. Avaliação do comportamento térmico das ceras

Os resultados das propriedades térmicas de fusão e cristalização das ceras, obtidos pela Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), são apresentados a seguir. Em um termograma, o formato das curvas e a faixa de fusão da amostra estão relacionados com a sua composição química e história térmica (NASSU, 1994). Os termogramas de fusão das ceras brutas de cana-de-açúcar e da cera de abelha são apresentados na Figura 19.

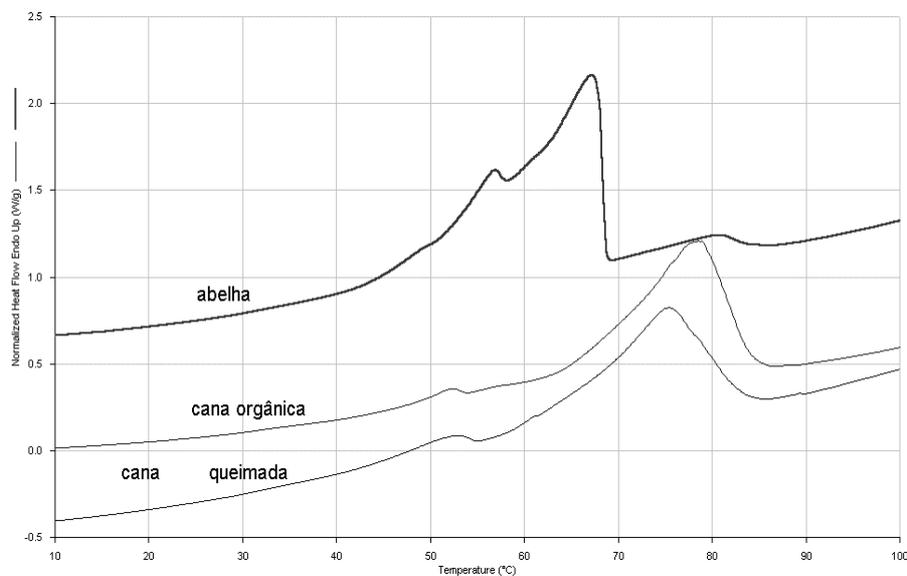


Figura 19. Termogramas de fusão de cera de abelha, cera bruta de cana orgânica e de cera bruta de cana queimada

Durante a fusão, as ceras brutas de cana e abelha apresentaram picos largos, com presença de picos sobrepostos. Essas ceras fundem-se em uma faixa entre 50 e 80°C, o que fornece indicação de que tais ceras não são componentes simples, mas misturas de componentes. No entanto, enquanto a cera de abelha apresentou temperatura máxima de fusão –  $T_{pico}$  (°C) a 65,9°C, as ceras brutas de cana-de-açúcar apresentaram picos de fusão entre 75,3 e 77,7°C.

A entalpia de fusão de uma amostra corresponde ao seu calor latente, ou seja, é a energia que deve ser fornecida à amostra para que ocorra uma completa fusão. O valor de entalpia é determinado pela área do pico. Constatou-se que a entalpia de fusão do pico principal da cera de abelha (186,04 J.g<sup>-1</sup>) foi maior do que a entalpia das ceras brutas de cana-de-açúcar (112,57 a 125,87 J.g<sup>-1</sup>).

Com relação à temperatura de início de fusão –  $T_{onset}$  (°C), também foram verificadas diferenças entre a cera de abelha e as ceras brutas de cana. A  $T_{onset}$  da cera de abelha foi 55,1°C, enquanto que das ceras brutas de cana foi a partir de 63,9°C. Não houve diferença considerável quanto ao tipo de cera bruta de cana, se de origem de cana-de-açúcar queimada ou orgânica.

Os termogramas de cristalização das ceras brutas de cana-de-açúcar e da cera de abelha são apresentados nas Figuras 20 a 22. Percebe-se que a cera de abelha apresentou, além do pico principal de cristalização a 62,6°C, picos a 70,1°C e 54,4°C.

As ceras brutas de cana-de-açúcar apresentaram picos de cristalização entre 64,9°C e 67,6°C. Porém, verificou-se a presença de um pico inicial de cristalização a 72,9°C na amostra de cera bruta de cana orgânica. A cera bruta de cana queimada também apresentou um pico de cristalização a 70,2°C. A exemplo do que foi observado durante a fusão, a entalpia de cristalização dos picos principais das ceras brutas de cana foi menor do que a entalpia de cristalização da cera de abelha.

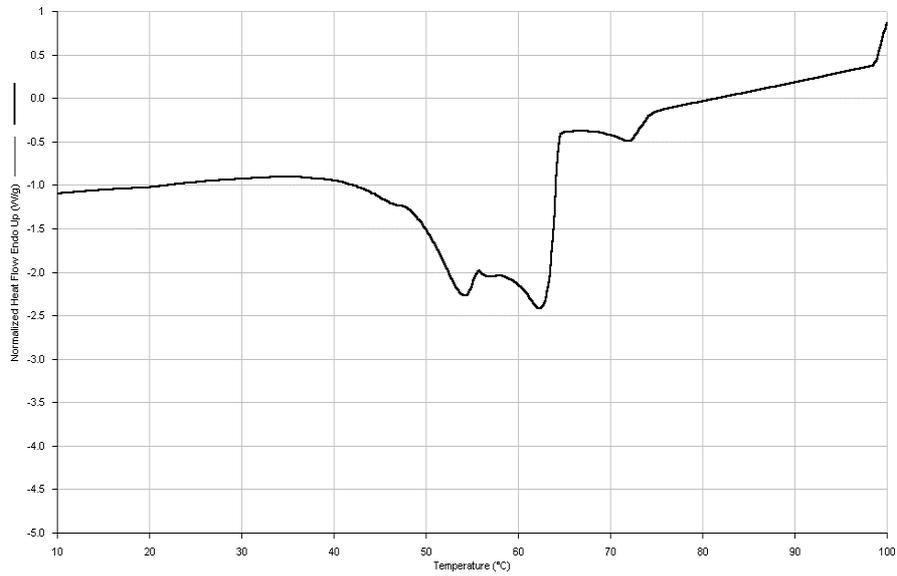


Figura 20. Termograma de cristalização de cera de abelha

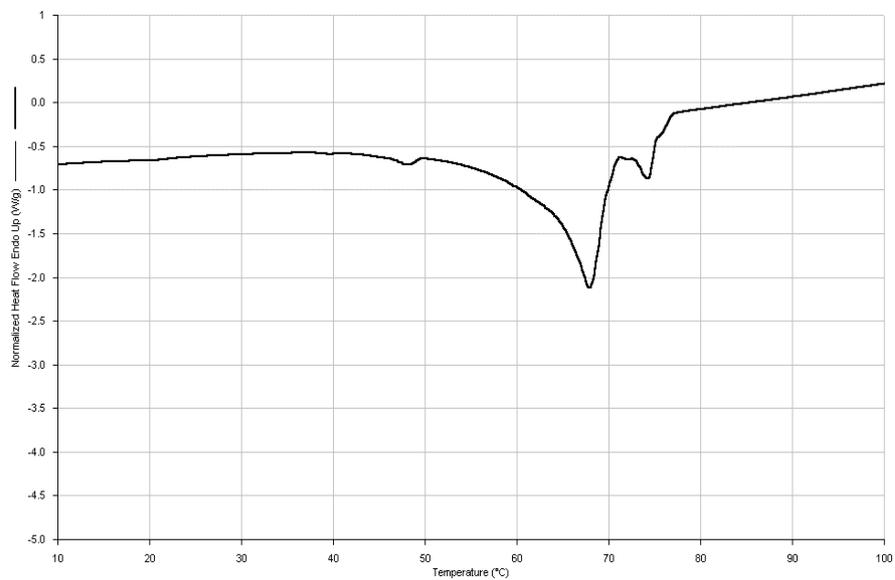


Figura 21. Termograma de cristalização de cera bruta de cana orgânica

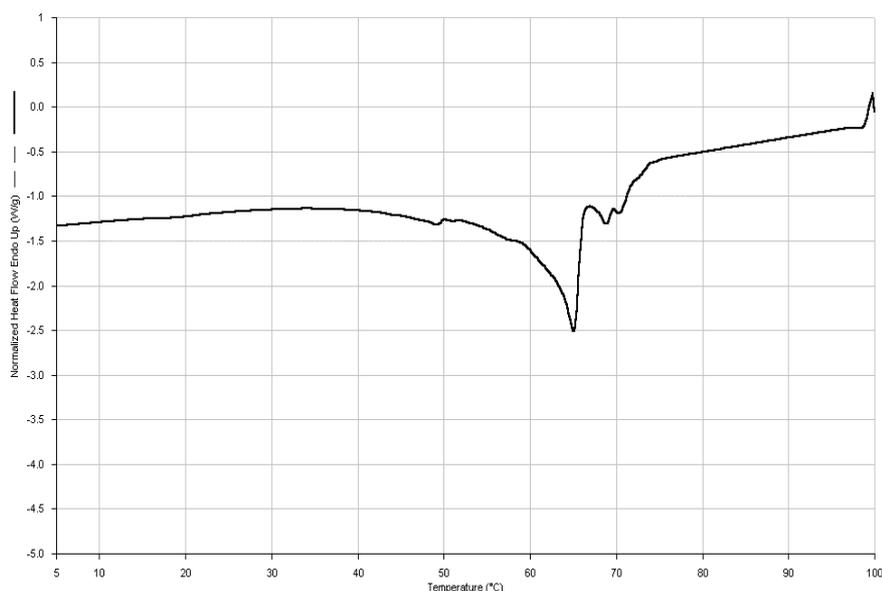


Figura 22. Termograma de cristalização de cera bruta de cana queimada

O comportamento de fusão e cristalização de uma amostra é relacionado ao tamanho da cadeia dos seus componentes, sejam ésteres de cera ou triglicerídios. A cera de abelha apresentou picos de fusão e cristalização largos, com temperaturas de pico mais baixas do que as das ceras de cana-de-açúcar. De fato, o ácido palmítico contribui com 78,24% dos ácidos graxos originalmente esterificados na cera de abelha. No entanto, o perfil de álcoois graxos da cera de abelha apresentou uma maior distribuição entre os componentes de 24 a 32 carbonos. É possível concluir que os ésteres da cera de abelha apresentaram cadeias de 40 a 48 carbonos, que se fundem e se cristalizam numa ampla faixa de temperatura.

As ceras brutas de cana-de-açúcar orgânica e queimada também apresentaram o ácido palmítico como principal componente (30,19% e 41,43%, respectivamente), porém em menores proporções quando comparadas à cera de abelha. A combinação dos ácidos palmítico e octacosanóico presentes nas ceras

brutas de cana com os álcoois graxos de cadeia longa contribuiria com a presença de ésteres de cadeia mais longa, com até 60 carbonos. Por esse motivo, os picos de fusão das ceras brutas de cana ocorreram a temperaturas mais altas. Contudo, foi observado pelas análises de CCD analítica que as ceras brutas de cana apresentam uma fração triglicerídica, o que provavelmente influenciou a entalpia de fusão e de cristalização das amostras.

A Figura 23 apresenta as curvas de fusão das ceras purificadas de cana-de-açúcar e da cera de carnaúba. Quando comparadas às ceras brutas, as endotermas de fusão das ceras purificadas de cana-de-açúcar exibiram uma menor faixa de temperatura, com um único pico entre 80,9°C e 81,7°C. As entalpias de fusão e altura desses picos foram maiores do que o observado para as ceras brutas de cana.

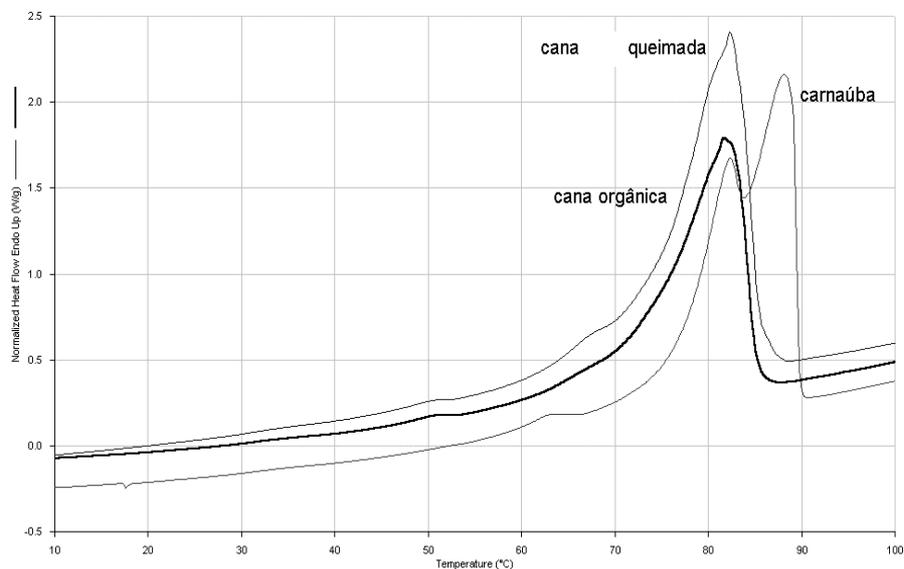


Figura 23. Termogramas de fusão de cera de carnaúba e ceras purificadas de cana orgânica e queimada

As energias requeridas ( $\text{J.g}^{-1}$ ) para as transições de fases, a altura dos picos ( $\text{W.g}^{-1}$ ), a temperatura de início ( $T_{\text{onset}}$ ) e temperatura de pico ( $T_{\text{pico}}$ ) de fusão e cristalização das amostras analisadas são apresentadas nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Parâmetros obtidos na fusão das ceras analisadas por DSC

| Amostra                         | $T_{\text{onset}}$<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | $T_{\text{pico}}$<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | Entalpia<br>$\Delta H$<br>( $\text{J.g}^{-1}$ ) | Altura do pico<br>( $\text{W.g}^{-1}$ ) |
|---------------------------------|--|---|---|---|
| abelha                          | 55,1   | 67,3  | 186,04  | 1,14                                    |
| cera bruta - cana orgânica      | 65,9   | 77,7  | 125,87  | 0,75                                    |
| cera bruta - cana queimada      | 63,9   | 75,3  | 112,57  | 1,60                                    |
| carnaúba                        | 76,4   | 88,1  | 206,64  | 1,86                                    |
| cera purificada - cana orgânica | 73,9   | 80,9  | 157,85  | 1,35                                    |
| cera purificada - cana queimada | 73,1   | 81,7  | 233,08  | 1,92                                    |

cada valor é a média de 2 repetições

Tabela 19. Parâmetros obtidos na cristalização das ceras analisadas por DSC

| Amostra                         | $T_{\text{onset}}$<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | $T_{\text{pico}}$<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | Entalpia<br>$\Delta H$<br>( $\text{J.g}^{-1}$ ) | Altura do pico<br>( $\text{W.g}^{-1}$ ) |
|---------------------------------|--|---|---|---|
| abelha                          | 64,7   | 62,6  | 182,30  | 2,07                                    |
| cera bruta - cana orgânica      | 69,7   | 67,6  | 117,96  | 2,11                                    |
| cera bruta - cana queimada      | 66,4   | 64,9  | 106,65  | 1,79                                    |
| carnaúba                        | 84,4   | 81,7  | 204,60  | 3,68                                    |
| cera purificada - cana orgânica | 75,8   | 74,3  | 178,56  | 4,55                                    |
| cera purificada - cana queimada | 76,9   | 74,8  | 219,23  | 5,43                                    |

cada valor é a média de 2 repetições

Nota-se que a cera de carnaúba apresentou comportamento bifásico na fusão, característica também observada no seu perfil de cristalização. Durante a cristalização, foram observados dois picos, a 75,8°C e a 81,7°C (Figura 24), indicativo de que a cera de carnaúba apresenta componentes com diferentes propriedades térmicas.

As amostras de cera purificada de cana apresentaram um único pico de cristalização, com maior entalpia e altura do que o observado nas amostras de cera bruta. Isso indica que a purificação da cera permitiu a obtenção de um material com propriedades térmicas mais próximas às da cera de carnaúba (Figuras 25 e 26).

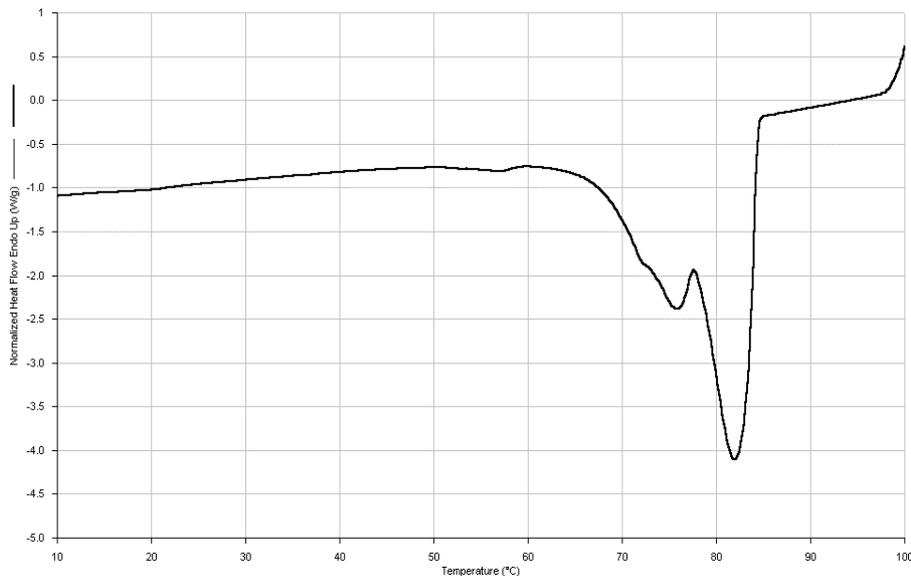


Figura 24. Curva de cristalização de cera de carnaúba

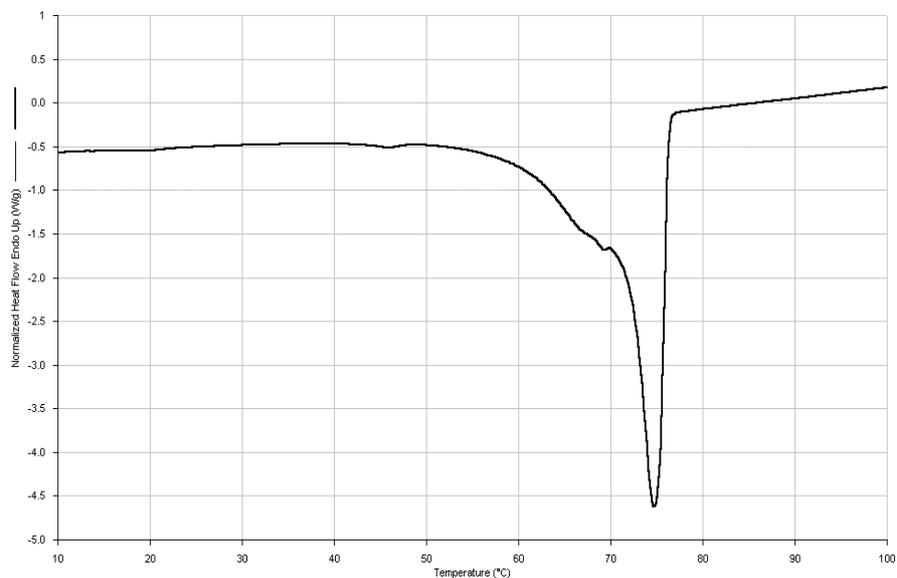


Figura 25. Curva de cristalização de cera purificada de cana orgânica

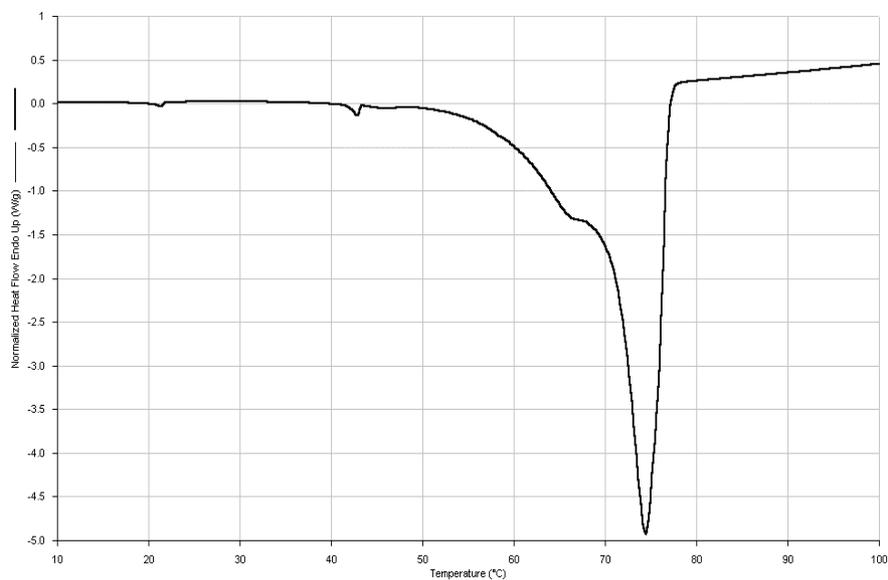


Figura 26. Curva de cristalização de cera purificada de cana queimada

De acordo com LIU et al. (1993), picos de fusão ou cristalização únicos e estreitos indicam que existem poucos tipos de ésteres de cera na amostra. Também se pressupõe que todos os componentes da mistura apresentem propriedades térmicas similares e formas de cristais semelhantes. Conclui-se, portanto, que o processo de purificação utilizado promoveu a obtenção de um material de alta pureza quanto à composição em classes de lipídios. Portanto, a fração de éster de cera foi efetivamente separada de outros componentes durante o processo de purificação das ceras brutas de cana-de-açúcar.

Essas observações podem ser perfeitamente correlacionadas aos resultados de composição das amostras em ácidos e álcoois graxos. Como resultado do processo de purificação, houve uma concentração do ácido octacosanóico e do octacosanol nas amostras de cera de cana-de-açúcar, ao passo que a proporção relativa de ácido palmítico originalmente presente nas ceras brutas sofreu uma redução significativa. Provavelmente, os triglicerídios presentes nas ceras brutas de cana-de-açúcar apresentavam altos teores de ácido palmítico, além dos ácidos oléico e linoléico, em sua composição.

A separação dessa fração triglicerídica mais mole foi responsável pelas alterações nos termogramas de fusão e cristalização das ceras purificadas de cana-de-açúcar. Conforme já foi apontado, baixos valores de entalpia como aqueles observados na fusão das ceras brutas de cana-de-açúcar são resultantes da presença de triglicerídios, que influenciam o processo endotérmico. LIU et al. (1996) observaram que a fração de triglicerídios em cera de girassol agiu como um solvente, diminuindo o ponto de fusão dos componentes mais sólidos da cera durante a análise por DSC.

Outras informações também podem ser obtidas através da análise dos termogramas apresentados pelas amostras. Analisando-se o comportamento térmico das ceras purificadas de cana-de-açúcar percebe-se que os picos de fusão foram simétricos. No entanto, a cristalização dessas amostras caracterizou-

se pela presença de um pico com início de cristalização bem definido, seguido por um ombro. Segundo LIU et al. (1994), a existência desse ombro se dá pelo crescimento de cristais formados por componentes de cristalização mais lenta. Isso significa que existe uma cristalização inicial rápida, mas que será completa com a redução da temperatura.

A Figura 27 apresenta as curvas de teor de sólidos das amostras analisadas. Segundo HWANG et al. (2002), a cera de carnaúba muitas vezes é adicionada a outras ceras para promover um aumento no ponto de fusão. Como as ceras purificadas de cana-de-açúcar também apresentaram alto ponto de fusão, poderiam ser utilizadas para esse fim.

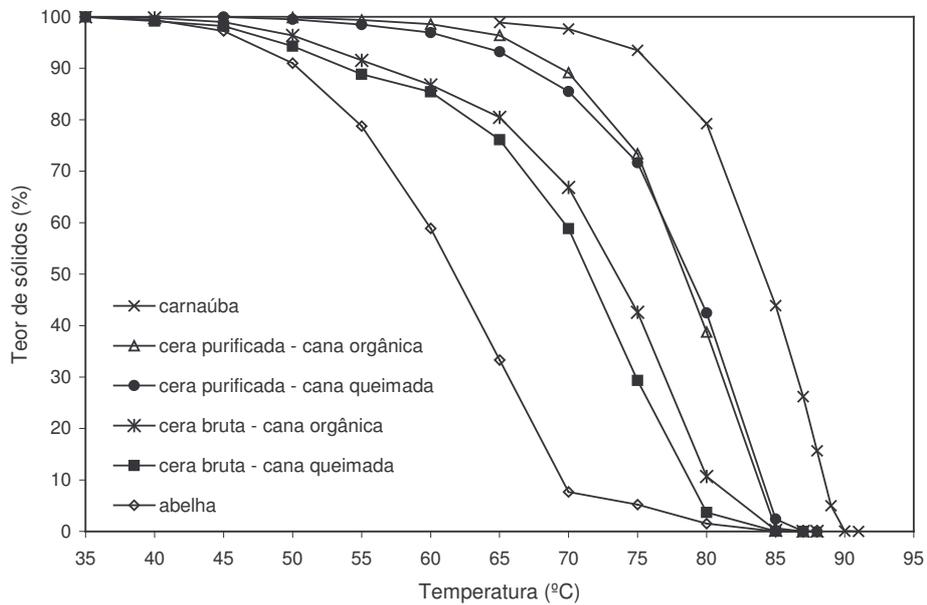


Figura 27. Teor de sólidos (%) de amostras de cera de cana-de-açúcar e ceras comerciais de abelha e carnaúba

#### 4.8. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

A cera bruta de cana queimada apresentou 4 tipos de HPAs: fluoranteno, metilcriseno, criseno e benzo-*a*-pireno. Verificou-se apenas a presença de fluoranteno na cera purificada de cana queimada, o que indica que o processo de purificação empregado exerceu a função de remover os HPAs provenientes da queima da cana-de-açúcar. As demais amostras (cera bruta de cana orgânica e ceras comerciais) também apresentaram apenas o fluoranteno em concentrações baixas, abaixo do limite de quantificação do método utilizado.

Os resultados obtidos concordam com o observado por SERRA et al. (1995), que não detectaram presença de HPAs em amostras de cana crua. No entanto, amostras de cana queimada, açúcares comerciais e aguardentes apresentaram contaminação com HPAs. Os níveis de contaminação observados pelos autores indicaram que pode haver um efeito de concentração dos HPAs originários da cana durante o processamento ou que as condições de processamento dos produtos podem levar à formação destes compostos.

Dos HPAs presentes na cera bruta de cana queimada, apenas o fluoranteno foi quantificado, pois esteve presente em um nível dentro do limite de quantificação do método utilizado. A curva de calibração do fluoranteno foi linear e o limite de quantificação do método aplicado à análise de ceras foi de  $15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . A Figura 28 apresenta a curva de calibração utilizada, a Tabela 20 o teor de fluoranteno na amostra de cera e a Figura 29 um exemplo de cromatograma obtido.

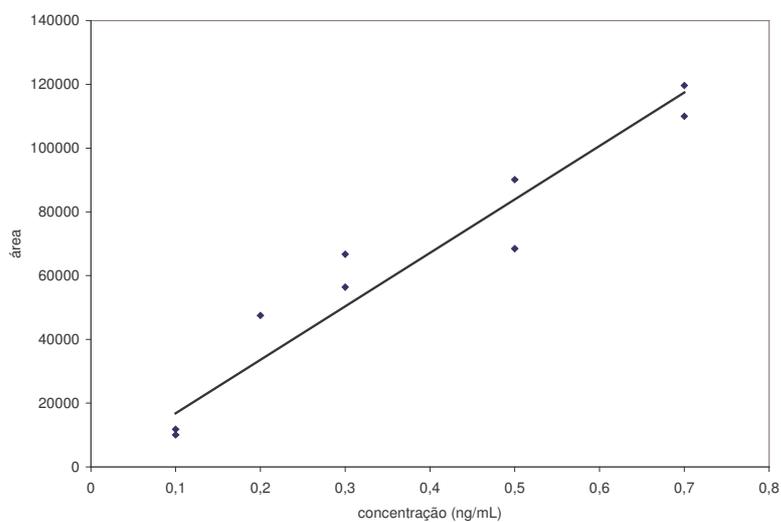


Figura 28. Curva de calibração utilizada para quantificação de fluoranteno.

Equação:  $concentração = 6E^{-6} \times área + 0,0017$  ( $R^2 = 0,9275$ )

Tabela 20. Teor de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de cera bruta de cana queimada ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )

|                | Teor de HPAs ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | desvio padrão |
|----------------|---|---------------|
| fluoranteno    | 17,56   | 0,311         |
| criseno        | tr  | -             |
| metilcriseno   | tr  | -             |
| benzo-a-pireno | tr  | -             |

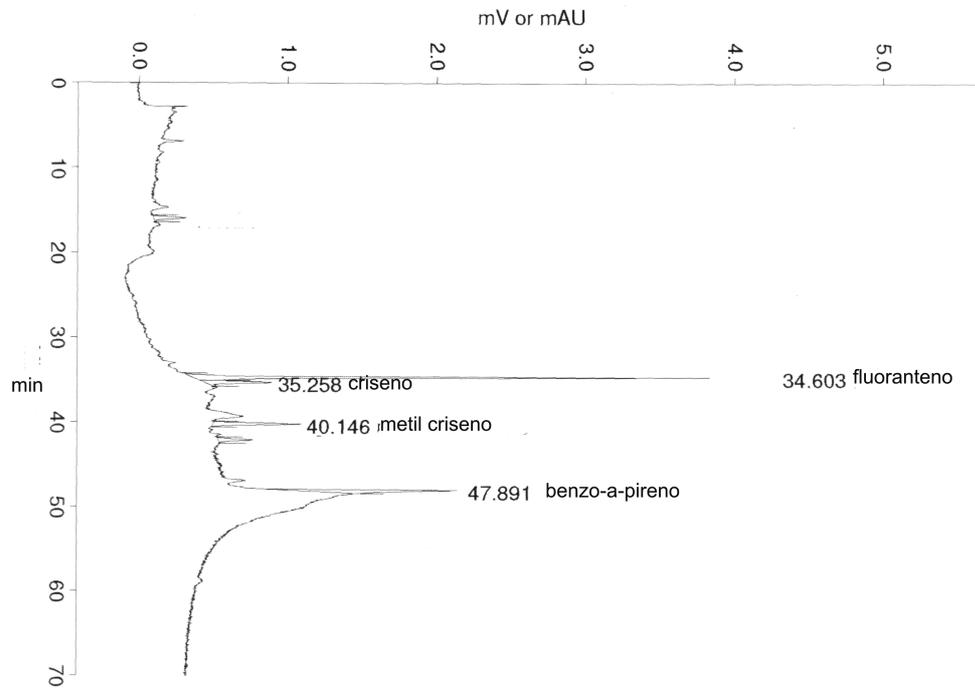


Figura 29. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostra de cera bruta de cana queimada. Detector: fluorescência

#### 4.9. Otimização da extração

O estudo da otimização do processo de extração foi realizado através de técnicas de planejamento experimental e análise de superfícies de resposta. As condições operacionais para obtenção do melhor rendimento foram investigadas, analisando-se três variáveis independentes: relação solvente:matéria-prima, tamanho de partícula e tempo de extração. A variável dependente (resposta) foi o rendimento relativo da extração.

Os valores estabelecidos para as variáveis independentes foram baseados em observações experimentais. O tamanho máximo de partícula estabelecido no nível  $+\alpha$ , equivalente a 4,5 mm, foi aproximadamente o observado na matéria prima originária da indústria. A relação solvente:matéria-prima de 5:1 foi a relação mínima para a operacionalidade do sistema. Os ensaios foram conduzidos com torta de filtração da cana orgânica, em ordem aleatória para evitar a ocorrência de distorções estatísticas nos resultados (BARROS NETO et al., 1996). A Tabela 21 apresenta os rendimentos obtidos no diferentes ensaios.

A Tabela 22 apresenta a estimativa dos efeitos sobre o rendimento relativo da extração. Verificou-se que as três variáveis apresentaram efeito linear significativo, mas somente a relação solvente:matéria-prima apresentou efeito quadrático significativo ( $p \leq 0,05$ ). Apesar de significativa, a variável que apresentou o menor efeito sobre o rendimento da extração foi o tamanho da partícula, ou seja, a redução de 4,0 mm para 2,0 mm promoveu acréscimo de somente 3,2% no rendimento relativo. Além disso, a interação entre esta variável e o tempo ou a relação solvente:matéria-prima não foi significativa.

Tabela 21. Rendimentos relativos (R %) obtidos no estudo de otimização do processo de extração de cera de cana-de-açúcar (planejamento experimental fatorial completo -  $2^3$ )

| Ensaio | variáveis independentes  |            |                  |            |                           |            | variável dependente |
|--------|--------------------------|------------|------------------|------------|---------------------------|------------|---------------------|
|        | solvente: matéria- prima |            | tempo (horas)    |            | tamanho de partícula (mm) |            | Rendimento          |
|        | valor codificado         | valor real | valor codificado | valor real | valor codificado          | valor real | relativo (%)        |
| 1      | -1                       | 7:1        | -1               | 2          | -1                        | 2          | 75,2                |
| 2      | +1                       | 13:1       | -1               | 2          | -1                        | 2          | 82,1                |
| 3      | -1                       | 7:1        | +1               | 5          | -1                        | 2          | 83,6                |
| 4      | +1                       | 13:1       | +1               | 5          | -1                        | 2          | 95,0                |
| 5      | -1                       | 7:1        | -1               | 2          | +1                        | 4          | 70,2                |
| 6      | +1                       | 13:1       | -1               | 2          | +1                        | 4          | 78,3                |
| 7      | -1                       | 7:1        | +1               | 5          | +1                        | 4          | 79,0                |
| 8      | +1                       | 13:1       | +1               | 5          | +1                        | 4          | 92,5                |
| 9      | -1,68                    | 5:1        | 0                | 3,5        | 0                         | 3          | 78,0                |
| 10     | +1,68                    | 15:1       | 0                | 3,5        | 0                         | 3          | 89,9                |
| 11     | 0                        | 10:1       | -1,68            | 1          | 0                         | 3          | 74,2                |
| 12     | 0                        | 10:1       | +1,68            | 6          | 0                         | 3          | 85,0                |
| 13     | 0                        | 10:1       | 0                | 3,5        | -1,68                     | 1,5        | 80,9                |
| 14     | 0                        | 10:1       | 0                | 3,5        | +1,68                     | 4,5        | 77,2                |
| 15     | 0                        | 10:1       | 0                | 3,5        | 0                         | 3          | 79,6                |
| 16     | 0                        | 10:1       | 0                | 3,5        | 0                         | 3          | 80,4                |
| 17     | 0                        | 10:1       | 0                | 3,5        | 0                         | 3          | 80,6                |

Tabela 22. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento relativo da extração (R %) de cera de tortas de filtro de cana-de-açúcar

|   | Efeito         | Desvio padrão | Nível descritivo (P) |
|---|----------------|---------------|----------------------|
| Média   | <b>80,1281</b> | <b>0,3049</b> | <b>0,00001</b>       |
| solvente:matéria-prima (L)                        | <b>8,7787</b>  | <b>0,2865</b> | <b>0,00106</b>       |
| solvente:matéria-prima (Q)                        | <b>3,1388</b>  | <b>0,3156</b> | <b>0,00996</b>       |
| tempo (L)   | <b>9,1528</b>  | <b>0,2865</b> | <b>0,00098</b>       |
| tempo (Q)   | 0,0563         | 0,3156        | 0,87492              |
| tamanho da partícula (L)                          | <b>-3,2417</b> | <b>0,2865</b> | <b>0,00772</b>       |
| tamanho da partícula (Q)                          | -0,3334        | 0,3156        | 0,40150              |
| solvente:matéria-prima X tempo (L)                | <b>2,4750</b>  | <b>0,3742</b> | <b>0,02210</b>       |
| solvente:matéria-prima X tamanho de partícula (L) | 0,8250         | 0,3742        | 0,15826              |
| tempo X tamanho de partícula (L)                  | 0,4250         | 0,3742        | 0,37403              |

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ( $P \leq 0,05$ )  
L = linear; Q = quadrático

Os termos não significativos foram ignorados e, com os resultados dos coeficientes de regressão, chegou-se ao modelo matemático polinomial de segunda ordem representado na equação a seguir (modelo codificado):

$$\text{Rendimento relativo (\%)} = 79,99 + 4,39 (\text{solvente:matéria-prima}) + 1,60 (\text{solvente:matéria-prima})^2 + 4,58 (\text{tempo}) - 1,62 (\text{tamanho partícula}) + 1,24 (\text{solvente:matéria-prima} \times \text{tempo})$$

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 23 mostrou que o valor do F calculado para a regressão a partir dos dados experimentais foi maior que o F tabelado. A porcentagem de variação explicada pela regressão demonstrou que 95% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo. O teste F

indicou que a falta de ajuste não foi estatisticamente significativa ao nível de 5% (F tabelado foi maior que o F calculado). Os resíduos foram explicados quase que exclusivamente pela falta de ajuste, já que o erro puro foi muito baixo.

Tabela 23. Análise de variância (ANOVA) para o rendimento relativo (R%) do processo de extração de cera de cana-de-açúcar.

| Fonte de variação | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média Quadrática | Teste F |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|---------|
| Regressão         | 630,02          | 5                  | 126,00           | 40,9    |
| Resíduo           | 33,85           | 11                 | 3,08             |         |
| Falta de ajuste   | 33,29           | 9                  | 3,70             | 13,2    |
| Erro puro         | 0,56            | 2                  | 0,28             |         |
| Total             | 663,87          | 16                 |                  |         |

$$R^2 = 0,95 \quad F_{0,95;5;11} = 3,20 \quad F_{0,95;9;2} = 19,38$$

As Figuras 30 a 32 apresentam os efeitos das variáveis independentes analisadas sobre o rendimento relativo da extração, representados pelas superfícies ajustadas aos modelos e seus respectivos gráficos de contorno. Na Tabela 22 pode-se observar o efeito linear significativo que a relação solvente:matéria-prima exerceu sobre o rendimento da extração (+8,77). A Figura 32 evidencia o efeito de interação entre a relação solvente:matéria-prima e o tempo de extração. Mantendo-se a relação solvente:matéria-prima em 5:1, ao passar de 2 horas para 5 horas verificou-se um aumento no rendimento relativo da faixa de 77,4% para 80,9%. No entanto, ao aumentar a quantidade de solvente para 13:1, o rendimento que em 2 horas de extração estava na faixa de 80,9% atingiu 95,1%. A análise da superfície permite concluir que um rendimento acima

de 95% pode ser atingido somente através do controle da quantidade de solvente utilizada e do tempo de extração.

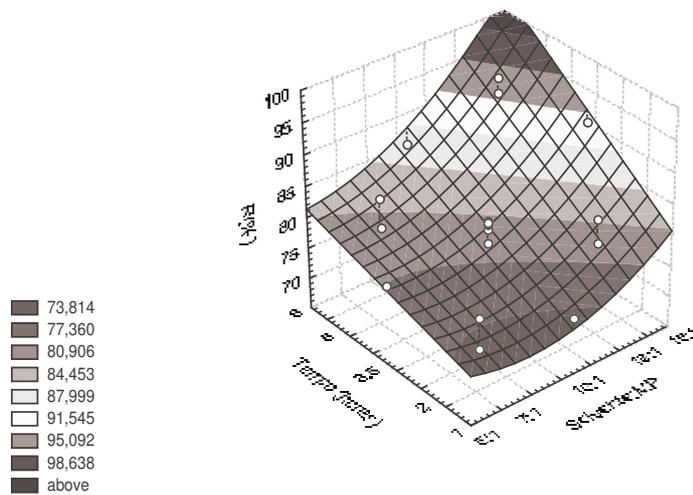
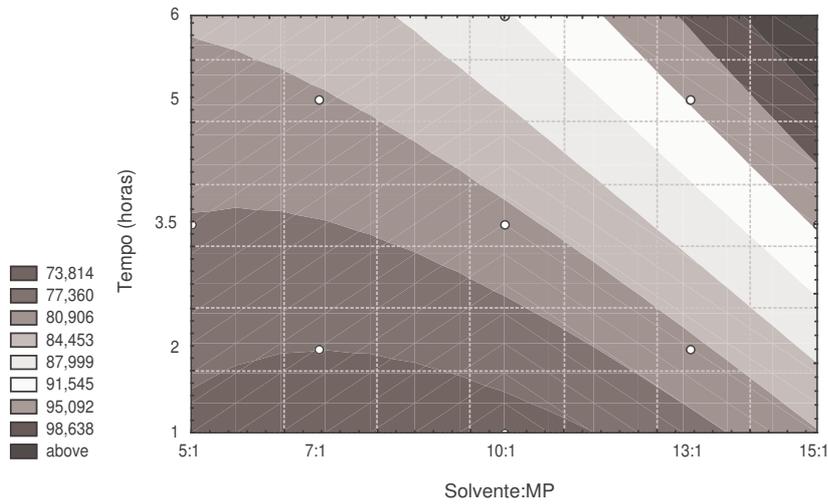


Figura 30. Efeito do tempo e da relação solvente:matéria-prima sobre o rendimento relativo da extração de cera de cana-de-açúcar. Variável tamanho de partícula fixada em 3,0 mm

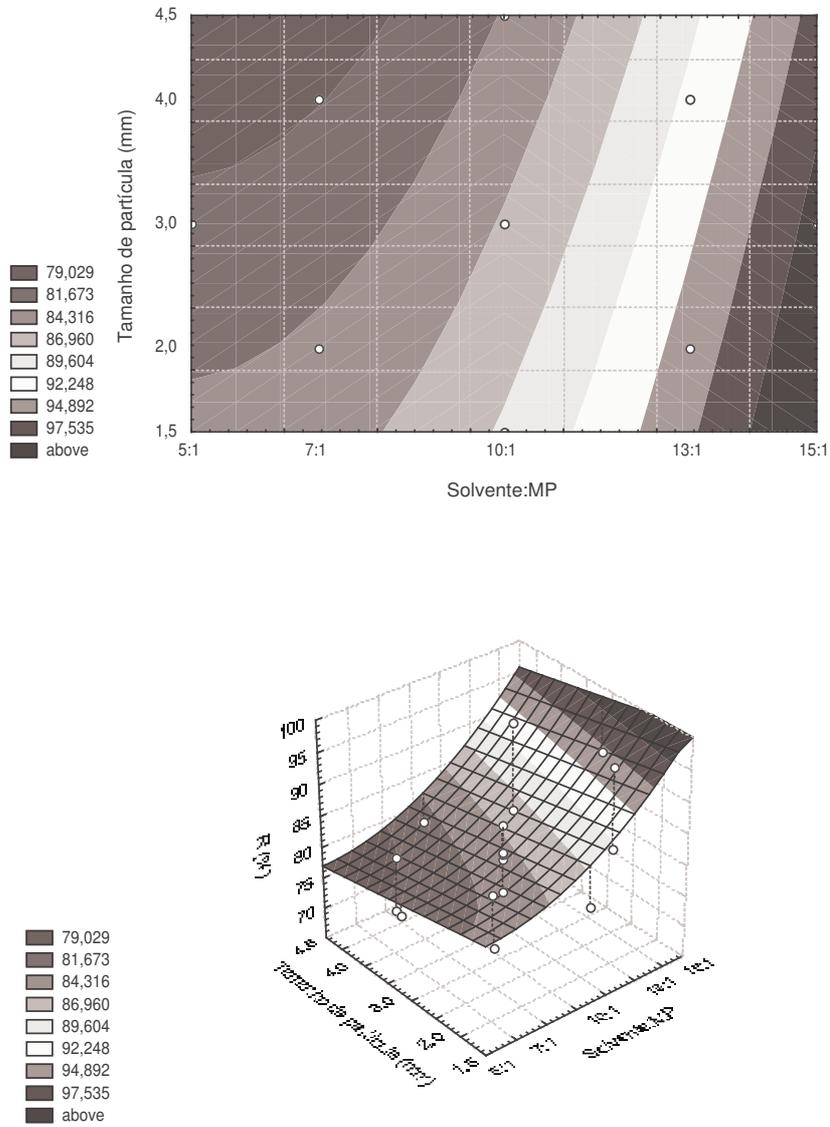


Figura 31. Efeito da relação solvente:matéria-prima e tamanho de partícula sobre o rendimento relativo da extração de cera de cana-de-açúcar. Variável tempo fixada em 5 horas

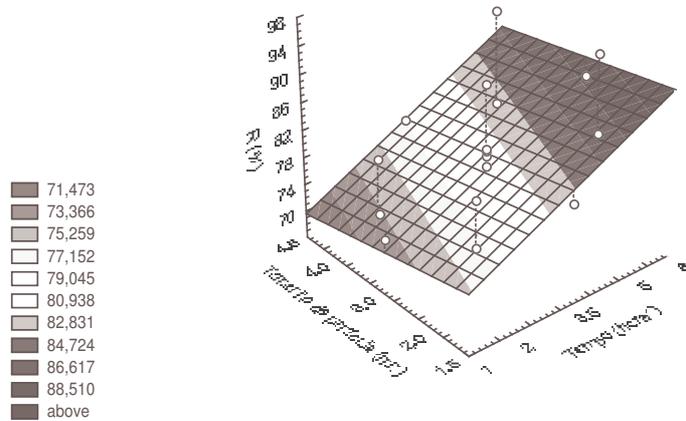
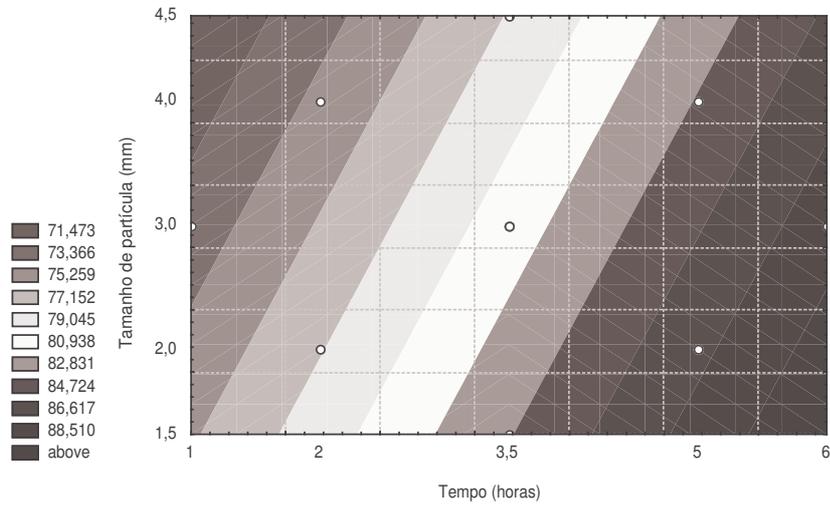


Figura 32. Efeito do tamanho de partícula e do tempo sobre o rendimento relativo da extração de cera de cana-de-açúcar. Variável solvente:matéria-prima fixada em 13:1

O tamanho da partícula é o fator que menos influenciou o rendimento da extração. Conforme apresentado na Tabela 22, a redução do tamanho de partícula apresentou efeito linear (-3,24), todavia menos intenso do que os efeitos das outras variáveis.

A Figura 31 mostra que o efeito da redução do tamanho de partícula sobre o rendimento foi mais intenso quando se utilizou menos solvente na extração. Com o aumento da relação solvente:materia prima verificou-se o efeito cada vez menor da redução do tamanho de partícula. Entretanto, analisando-se a relação entre o tempo de extração e o tamanho de partícula (Figura 34), verificou-se que houve uma uniformidade no aumento do rendimento da extração em função das alterações nos níveis dessas variáveis. Apesar disso, mantendo-se a relação solvente:torta de filtro em 13:1, a extração durante 5 horas deveria proporcionar um rendimento relativo superior a 90%, independentemente do tamanho de partícula utilizado.

A determinação das condições ótimas de extração de cera de cana-de-açúcar da torta de filtro estudada foi feita através da análise dos gráficos de contorno, sendo estabelecidos os valores para cada uma das três variáveis independentes avaliadas que proporcionassem rendimento relativo maior que 90%.

A validação prática do modelo experimental obtido foi realizada através de ensaios de extração conduzidos sob duas condições. Utilizando-se a relação solvente:materia-prima de 15:1, tempo de 5 horas e tamanho de partícula de 4,0 mm obteve-se um rendimento relativo de 97,5%. Um segundo ensaio, com relação solvente:materia-prima de 13:1, tempo de 6 horas e tamanho de partícula de 4,0 mm, proporcionou rendimento relativo de 95,0%. Comparando-se os resultados obtidos com a utilização do modelo matemático codificado (97,0% e 94,1%) aos resultados obtidos experimentalmente (97,5% e 95,0%), confirma-se a conclusão teórica de que o modelo proposto é preditivo.

#### 4.10. Estudo do processo de purificação

Vários trabalhos publicados tratam do fracionamento de gorduras mediante o uso de solventes de diferentes polaridades. No entanto, existem poucas informações disponíveis quanto aos parâmetros aplicados na cristalização fracionada de cera de cana-de-açúcar. As publicações encontradas apenas indicam que a fração dura da cera pode ser separada da cera bruta com o uso de solventes seletivos, como a acetona. Os lipídios solúveis em acetona são rapidamente solubilizados e a porção de cera dura insolúvel pode ser separada por filtração ou centrifugação (PATURAU, 1989).

De fato, a solubilidade é um fator importante no fracionamento de lipídios com solventes. Os componentes de uma amostra que diferem quanto à solubilidade a uma dada temperatura podem ser separados na cristalização fracionada (THOMAS, 1985). Contudo, a seletividade do solvente não apresentou efeito no rendimento do processo de fracionamento realizado por GROMPONE et al. (1989). Os autores utilizaram hexano (relação solvente:gordura de 10:1) e temperaturas de cristalização de 1°C e 4°C no fracionamento de sebo, obtendo, respectivamente, rendimentos de 28% e 30% em fase sólida, com pontos de fusão de 54,8°C e 55,6°C. Resultados semelhantes foram obtidos com utilização de acetona, mas com temperatura de cristalização de 10°C.

Em geral, solventes apolares como o hexano requerem temperaturas de cristalização mais baixas do que os solventes polares, e conseqüentemente mais energia é requerida no resfriamento. Mas a escolha do solvente deve envolver, além do aspecto econômico, uma série de considerações sobre o tipo de produto fracionado desejado, segurança, estabilidade e perdas de voláteis (THOMAS, 1985).

O hexano, que já foi utilizado na extração da cera bruta de cana-de-açúcar, foi escolhido como solvente a ser utilizado neste estudo. O uso do hexano pode permitir que o processo de fracionamento seja aplicado diretamente à

miscela proveniente da extração, o que representa um aspecto prático importante. Com base nos estudos preliminares, foram determinados os limites da taxa de resfriamento e a velocidade de agitação mais adequada, buscando obter uma fração com boas propriedades de filtração. As faixas de estudo da temperatura de cristalização também foram definidas em ensaios preliminares, com base no rendimento do processo.

O estudo foi realizado através de técnicas de planejamento experimental e análise de superfícies de resposta. A relação cera bruta:solvente foi mantida em 1:20 e a agitação a 20 rpm. A Tabela 24 apresenta os rendimentos em fração sólida (cera precipitada, %, p/p) obtidos em cada um dos ensaios, bem como os valores de *Tonset* (°C), entalpia ( $J.g^{-1}$ ) e altura do pico ( $W.g^{-1}$ ) obtidos a partir dos termogramas de fusão das frações de cera separadas no processo.

A Tabela 25 apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento do processo. Tanto a temperatura de cristalização (°C), quanto a taxa de resfriamento ( $^{\circ}C.min^{-1}$ ), apresentaram efeitos lineares significativos, mas somente a temperatura de cristalização teve um efeito quadrático significativo. A interação entre as duas variáveis também não foi significativa em  $p < 0,05$ .

Tabela 24. Respostas obtidas nos ensaios do estudo do processo de purificação da cera bruta de cana-de-açúcar (planejamento experimental fatorial completo - 2<sup>2</sup>)

| Ensaio | variáveis independentes           |            |  |            | variáveis dependentes |                       |  |  |
|--------|-----------------------------------|------------|--|------------|-----------------------|-----------------------|--|--|
|        | Temperatura de cristalização (°C) |            | Taxa de resfriamento (°C min <sup>-1</sup> ) |            | Rendimento (%)        | T onset de fusão (°C) | Entalpia de fusão (J.g <sup>-1</sup> ) | Altura do pico de fusão (W.g <sup>-1</sup> ) |
|        | valor codificado                  | valor real | valor codificado                             | valor real |                       |                       |  |  |
| 1      | -1                                | 5          | -1   | 0,3        | 74,2                  | 66,2                  | 105,2                                  | 0,807  |
| 2      | +1                                | 15         | -1   | 0,3        | 60,0                  | 69,1                  | 157,3                                  | 1,235  |
| 3      | -1                                | 5          | +1   | 1,3        | 65,4                  | 67,4                  | 135,9                                  | 1,200  |
| 4      | +1                                | 15         | +1   | 1,3        | 57,5                  | 72,7                  | 160,8                                  | 1,519  |
| 5      | -1,41                             | 3          | 0  | 0,8        | 66,5                  | 69,9                  | 115,8                                  | 0,901  |
| 6      | +1,41                             | 17         | 0  | 0,8        | 58,0                  | 72,4                  | 159,6                                  | 1,310  |
| 7      | 0                                 | 10         | -1,41  | 0,1        | 78,9                  | 65,2                  | 99,2                                   | 0,870  |
| 8      | 0                                 | 10         | +1,41  | 1,5        | 62,1                  | 71,1                  | 145,9                                  | 1,245  |
| 9      | 0                                 | 10         | 0  | 0,8        | 64,9                  | 68,1                  | 121,0                                  | 0,928  |
| 10     | 0                                 | 10         | 0  | 0,8        | 66,9                  | 68,8                  | 121,9                                  | 0,946  |
| 11     | 0                                 | 10         | 0  | 0,8        | 65,8                  | 67,7                  | 121,3                                  | 0,975  |

Tabela 25. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento (%) do processo de purificação da cera de cana-de-açúcar

|  | Efeito         | Desvio padrão | Nível descritivo (P) |
|--|----------------|---------------|----------------------|
| Média                                  | <b>65,875</b>  | <b>0,5783</b> | <b>0,000077</b>      |
| temperatura de cristalização (L)       | <b>-8,5467</b> | <b>0,7093</b> | <b>0,006818</b>      |
| temperatura de cristalização (Q)       | <b>-4,7048</b> | <b>0,8464</b> | <b>0,030879</b>      |
| taxa de resfriamento (L)               | <b>-8,7731</b> | <b>0,7093</b> | <b>0,006474</b>      |
| taxa de resfriamento (Q)               | 3,5949         | 0,8464        | 0,051216             |
| temperatura X taxa de resfriamento (L) | 3,1500         | 1,0017        | 0,087978             |

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ( $P \leq 0,05$ )  
L = linear; Q = quadrático

Os termos não significativos foram ignorados e, com os resultados dos coeficientes de regressão, chegou-se ao modelo matemático polinomial de segunda ordem representado na equação a seguir (modelo codificado):

$$\text{Rendimento (\%)} = 67,55 - 4,27 (\text{temperatura de cristalização}) - 2,87 (\text{temperatura de cristalização})^2 - 4,38 (\text{taxa de resfriamento})$$

A análise de variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 26. Observa-se através do teste F que o F calculado para a regressão a partir dos dados experimentais foi maior que o F tabelado, indicando que a equação foi estatisticamente significativa, embora não possa ser utilizada para fins preditivos. A variação explicada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) demonstrou que 83% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo. Através do teste F verificou-se que a falta de ajuste ao modelo não foi estatisticamente significativa (F tabelado foi maior que o F calculado).

Tabela 26. Análise de variância (ANOVA) para o rendimento (%) do processo de purificação da cera de cana-de-açúcar

| Fonte de variação | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média Quadrática | Teste F |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|---------|
| Regressão         | 349,77          | 3                  | 116,59           | 11,50   |
| Resíduo           | 70,95           | 7                  | 10,13            |         |
| Falta de ajuste   | 68,95           | 5                  | 13,79            | 13,79   |
| Erro puro         | 2,00            | 2                  | 1,00             |         |
| Total             | 420,72          | 10                 |                  |         |

$R^2 = 0,83$      $F_{0,95;3;7} = 4,35$      $F_{0,95;5;2} = 19,30$

Na Figura 33 estão representados os gráficos bi e tridimensionais que demonstram o comportamento das variáveis estudadas sobre o rendimento do processo. Observa-se que com o aumento da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento houve uma redução no rendimento da fração sólida. Entretanto, variações dentro de uma faixa de taxa de resfriamento baixa ( $0,1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  a  $0,4 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ ) não apresentaram efeito sobre o rendimento da fração sólida dentro da faixa de temperatura de cristalização de  $3^\circ\text{C}$  a  $12^\circ\text{C}$ . A superfície apresentada evidencia que a variação da taxa de resfriamento exerceu efeito mais intenso a temperaturas de cristalização a partir de  $15^\circ\text{C}$ .

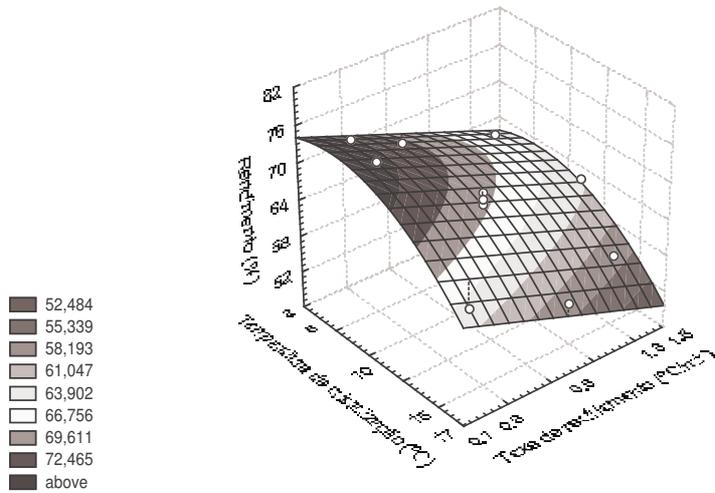
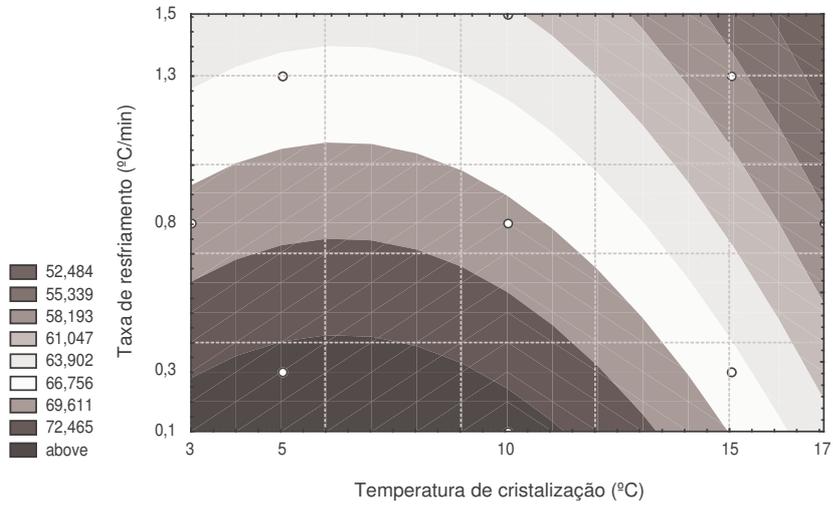


Figura 33. Efeito da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre o rendimento em fração sólida (%) durante o processo de purificação de cera de cana-de-açúcar

As variáveis analisadas também influenciaram significativamente as propriedades térmicas das frações obtidas. Na Tabela 27 estão apresentados os seus efeitos sobre a temperatura de início de fusão das frações (*Tonset* - °C). Verificou-se que tanto a temperatura de cristalização (linear e quadrática) quanto a taxa de resfriamento (linear) foram significativas em  $p < 0,05$ , e portanto, tiveram influência sobre a temperatura de início de fusão das frações. O efeito linear positivo das variáveis indica que aumentando-se a temperatura de cristalização de 5°C para 15°C, haverá um aumento de 2,9°C na *Tonset*. Da mesma maneira, com o aumento na taxa de resfriamento (0,3 para 1,3 °C.min<sup>-1</sup>), maior será a temperatura de início de fusão da amostra. Esses efeitos eram esperados, já que frações mais duras deveriam ser obtidas com a utilização de maiores temperaturas de cristalização. Assim como foi observado para a resposta rendimento, não houve interação significativa entre as variáveis estudadas.

Tabela 27. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a *Tonset* (°C) de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar

|  | Efeito         | Desvio padrão | Nível descritivo (P) |
|--|----------------|---------------|----------------------|
| Média                                  | <b>68,2038</b> | <b>0,3214</b> | <b>0,000022</b>      |
| temperatura de cristalização (L)       | <b>2,9400</b>  | <b>0,3943</b> | <b>0,017515</b>      |
| temperatura de cristalização (Q)       | <b>2,5487</b>  | <b>0,4705</b> | <b>0,032427</b>      |
| taxa de resfriamento (L)               | <b>3,2860</b>  | <b>0,3943</b> | <b>0,014094</b>      |
| taxa de resfriamento (Q)               | -0,4339        | 0,4705        | 0,453690             |
| temperatura X taxa de resfriamento (L) | 1,2000         | 0,5568        | 0,163920             |

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ( $P \leq 0,05$ )  
L = linear; Q = quadrático

Os termos não significativos foram ignorados e com os resultados dos coeficientes de regressão chegou-se ao modelo matemático polinomial de segunda ordem representado na equação a seguir (modelo codificado):

$$\text{Tonset } (^{\circ}\text{C}) = 68,00 + 1,47 (\text{temperatura de cristalização}) + 1,33 (\text{temperatura de cristalização})^2 + 1,64 (\text{taxa de resfriamento})$$

A análise de variância do modelo proposto para a determinação da *Tonset* de fusão é apresentada na Tabela 28. Pelo teste F pode-se concluir que o modelo proposto é válido e útil para fins preditivos, pois a regressão é estatisticamente significativa ( $F_{\text{calculado}} = 3,37.F_{\text{tabelado}}$ ) e a falta de ajuste não é estatisticamente significativa. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) mostra que 86% dos pontos obtidos se ajustam ao modelo. Na Figura 34 é apresentada a superfície ajustada ao modelo e seu respectivo gráfico de contorno.

Tabela 28. Análise de variância (ANOVA) para a *Tonset* ( $^{\circ}\text{C}$ ) de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar

| Fonte de variação | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média Quadrática | Teste F |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|---------|
| Regressão         | 49,72           | 3                  | 16,57            | 14,66   |
| Resíduo           | 7,95            | 7                  | 1,13             |         |
| Falta de ajuste   | 7,33            | 5                  | 1,47             | 4,74    |
| Erro puro         | 0,62            | 2                  | 0,31             |         |
| Total             | 57,67           | 10                 |                  |         |

$$R^2 = 0,86 \quad F_{0,95;3;7}=4,35 \quad F_{0,95;5;2}= 19,30$$

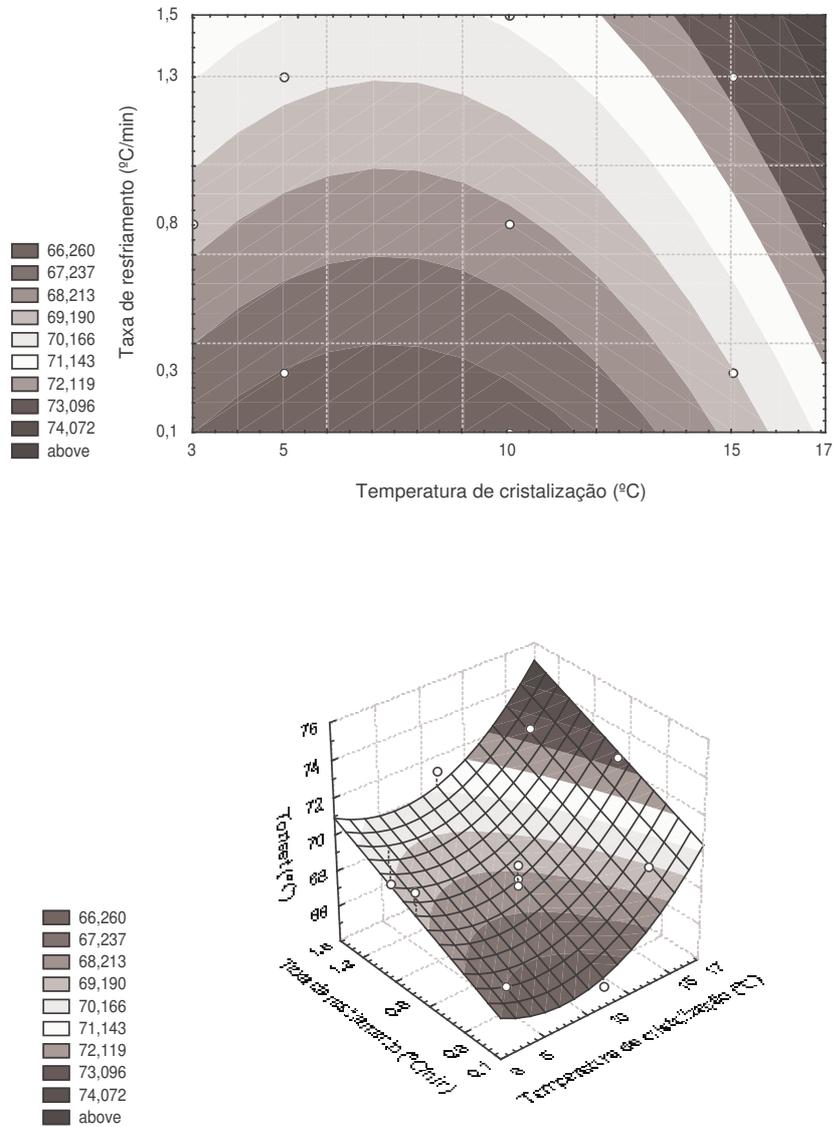


Figura 34. Efeito da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre a  $T_{onset}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) da fração sólida obtida no processo de purificação da cera de cana-de-açúcar

Comparando esta superfície à apresentada na Figura 35, pode-se verificar que a distribuição das faixas de resposta dos gráficos de contorno traçados para o rendimento da fração sólida (%) e para a *Tonset* de fusão (°C) apresentaram um padrão inversamente proporcional. Comparando-se esses dois gráficos, percebe-se que a faixa de menor rendimento foi a que apresentou maior *Tonset*.

A análise de um termograma fornece muitas indicações sobre a amostra analisada. Conforme já foi discutido anteriormente, a entalpia de fusão de uma amostra de cera está relacionada à sua composição. Além disso, o formato do pico de fusão pode servir como instrumento para a comparação de diferentes amostras no que diz respeito à homogeneidade de composição. Por esse motivo, os efeitos das variáveis do processo de purificação sobre a entalpia de fusão e altura dos picos foram avaliados.

O interesse na verificação dessas respostas foi somente o de se obterem superfícies de resposta ajustadas aos coeficientes de regressão significativos para um melhor entendimento do processo. Para tanto, foram avaliados os efeitos das variáveis independentes, analisaram-se os termos significativos e a definiram-se os coeficientes de regressão. A obtenção de modelos matemáticos para essas duas respostas não foi o foco do estudo, mas sim uma etapa para se traçarem as superfícies ajustadas.

A Tabela 29 apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a entalpia de fusão das frações de cera. Todos os termos foram significativos, e com os resultados dos coeficientes de regressão chegou-se ao modelo matemático polinomial de segunda ordem representado na equação a seguir (modelo codificado):

$$\begin{aligned} \text{Entalpia de fusão (J g}^{-1}\text{)} = & 121,36 + 17,39 (\text{temperatura de cristalização}) \\ & + 10,63 (\text{temperatura de cristalização})^2 + 12,54 (\text{taxa de} \\ & \text{resfriamento}) + 3,01 (\text{taxa de resfriamento})^2 - 6,80 (\text{temperatura} \\ & \text{de cristalização}).(\text{taxa de resfriamento}) \end{aligned}$$

A Tabela 30 apresenta a análise de variância do modelo proposto.

Tabela 29. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a entalpia de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar

|  | Efeito          | Desvio padrão | Nível descritivo (P) |
|--|-----------------|---------------|----------------------|
| Média                                  | <b>121,3618</b> | <b>0,2646</b> | <b>0,000005</b>      |
| temperatura de cristalização (L)       | <b>34,7930</b>  | <b>0,3245</b> | <b>0,000087</b>      |
| temperatura de cristalização (Q)       | <b>21,2759</b>  | <b>0,3872</b> | <b>0,000331</b>      |
| taxa de resfriamento (L)               | <b>25,0864</b>  | <b>0,3245</b> | <b>0,000167</b>      |
| taxa de resfriamento (Q)               | <b>6,0353</b>   | <b>0,3872</b> | <b>0,004092</b>      |
| temperatura X taxa de resfriamento (L) | <b>-13,6000</b> | <b>0,4583</b> | <b>0,001133</b>      |

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ( $P \leq 0,05$ )  
L = linear; Q = quadrático

Tabela 30. Análise de variância (ANOVA) para a entalpia de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar

| Fonte de variação | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média Quadrática | Teste F |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|---------|
| Regressão         | 4487,74         | 5                  | 897,54           | 13,19   |
| Resíduo           | 340,02          | 5                  | 68,00            |         |
| Falta de ajuste   | 339,60          | 3                  | 113,20           | 539,04  |
| Erro puro         | 0,42            | 2                  | 0,21             |         |
| Total             | 4827,76         | 10                 |                  |         |

$R^2 = 0,92$      $F_{0,95;5;5} = 5,0$      $F_{0,95;2;3} = 9,55$

Através do teste F pode-se concluir que a regressão foi estatisticamente significativa ( $F_{\text{calculado}} = 2,64.F_{\text{Tabelado}}$ ), embora o modelo não possa ser utilizado para fins preditivos. O teste F para a falta de ajuste também foi estatisticamente significativo. Apesar da falta de ajuste ser significativa, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi alto, indicando que 92% da variação é explicada pela regressão. Ainda pode-se associar a falta de ajuste observada ao erro puro, que foi muito baixo.

A Tabela 31 apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a altura dos picos de fusão.

Tabela 31. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a altura do pico de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar

|  | Efeito        | Desvio padrão | Nível descritivo (P) |
|--|---------------|---------------|----------------------|
| Média                                  | <b>0,9492</b> | <b>0,0137</b> | <b>0,000208</b>      |
| temperatura de cristalização (L)       | <b>0,3319</b> | <b>0,0168</b> | <b>0,002550</b>      |
| temperatura de cristalização (Q)       | <b>0,2115</b> | <b>0,0200</b> | <b>0,008858</b>      |
| taxa de resfriamento (L)               | <b>0,3023</b> | <b>0,0168</b> | <b>0,003071</b>      |
| taxa de resfriamento (Q)               | <b>0,1632</b> | <b>0,0200</b> | <b>0,014742</b>      |
| tempertaura X taxa de resfriamento (L) | -0,0545       | 0,0237        | 0,148325             |

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ( $P \leq 0,05$ )  
L = linear; Q = quadrático

O termo não significativo foi ignorado e com os resultados dos coeficientes de regressão chegou-se ao modelo matemático polinomial de segunda ordem representado na equação a seguir (modelo codificado):

$$\text{Altura do pico de fusão (W.g}^{-1}\text{)} = 0,949 + 0,165 (\text{temperatura de cristalização}) + 0,105 (\text{temperatura de cristalização})^2 + 0,151 (\text{taxa de resfriamento}) + 0,081 (\text{taxa de resfriamento})^2$$

A análise de variância, apresentada na Tabela 32, demonstra que a porcentagem de variação explicada pela regressão é adequada ( $R^2 = 0,93$ ), o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo a 5% de significância e utilizado para fins preditivos, pois o F calculado (24) foi maior 5,5 vezes que o F tabelado (4,39).

Tabela 32. Análise de variância (ANOVA) para a altura do pico de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar.

| Fonte de variação | Soma Quadrática | Graus de liberdade | Média Quadrática | Teste F |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|---------|
| Regressão         | 0,480           | 4                  | 0,120            | 24,0    |
| Resíduo           | 0,033           | 6                  | 0,005            |         |
| Falta de ajuste   | 0,032           | 4                  | 0,008            | 16,0    |
| Erro puro         | 0,001           | 2                  | 0,0005           |         |
| Total             | 0,513           | 10                 |                  |         |

$$R^2 = 0,93 \quad F_{0,95;4;6} = 4,39 \quad F_{0,95;4;2} = 19,25$$

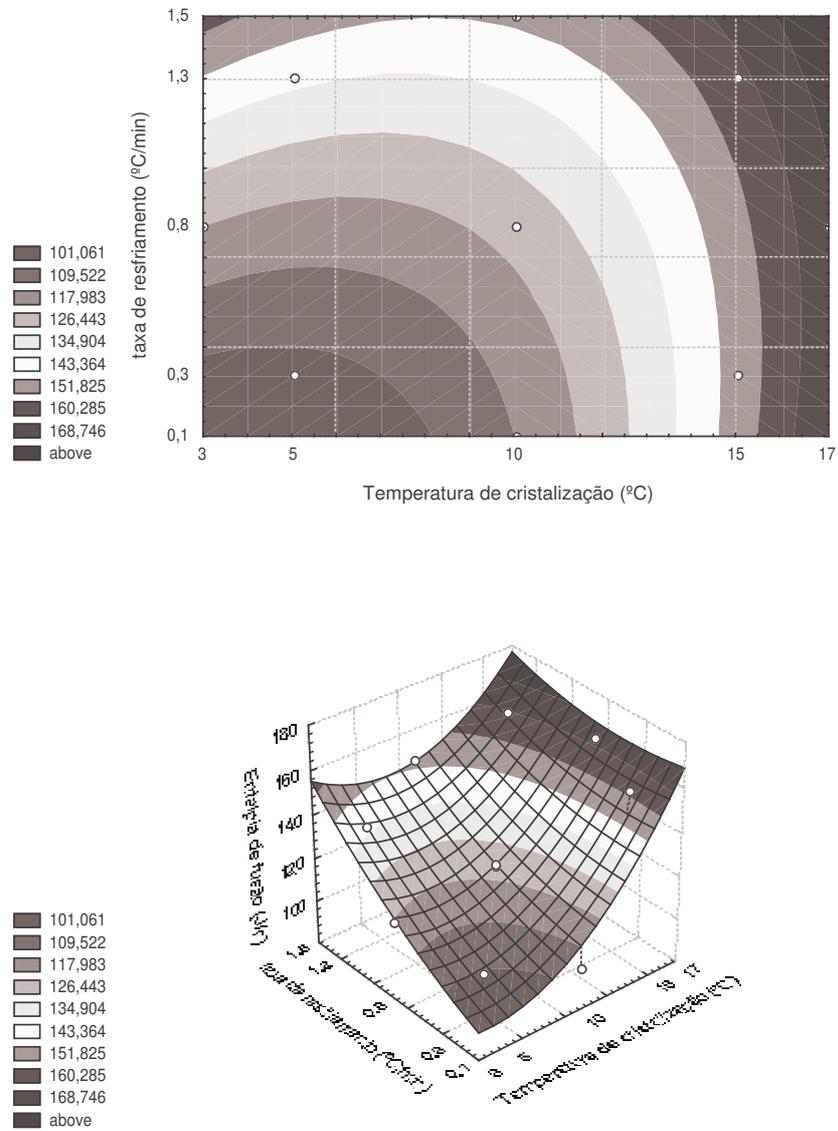


Figura 35. Efeito da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre a entalpia de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar

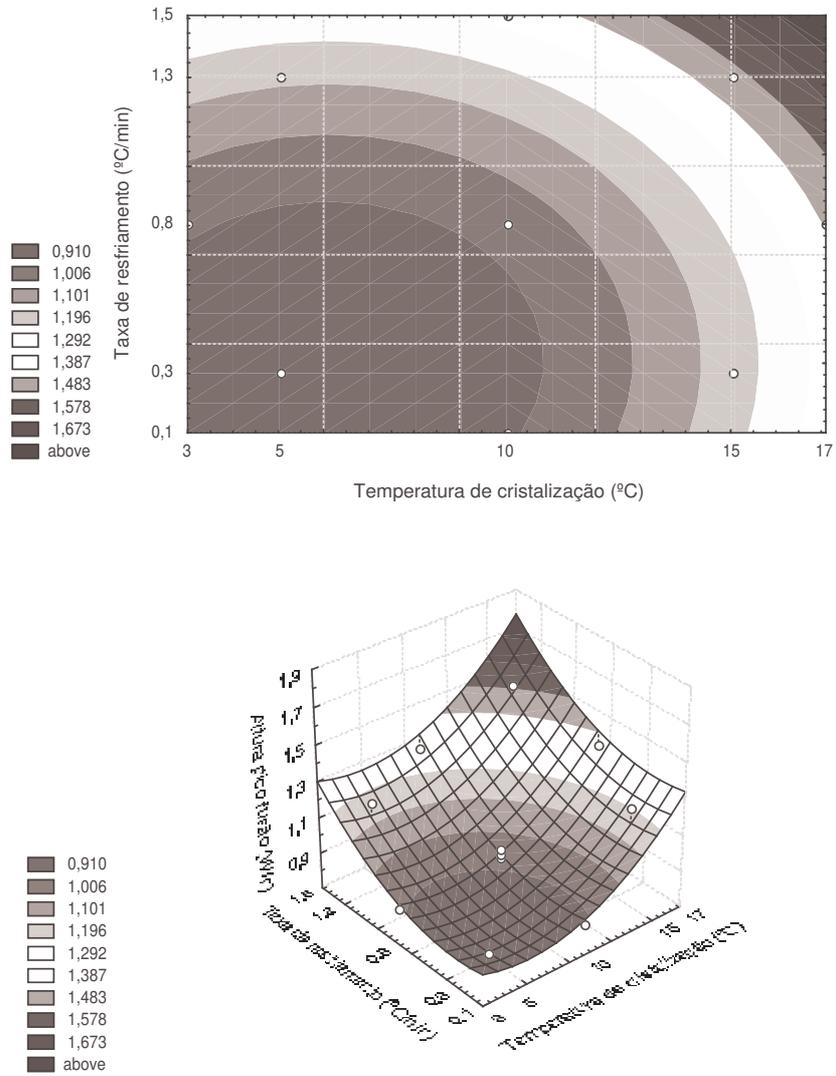


Figura 36. Efeito da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre a altura do pico de fusão das frações obtidas nos ensaios de purificação da cera de cana-de-açúcar

As Figuras 35 e 36 demonstram que tanto a temperatura de cristalização quanto a taxa de resfriamento podem ser ajustadas para se obterem frações de cera com diferentes propriedades térmicas. Endotermas de fusão com alto valor de entalpia ( $>$  que  $160,2 \text{ J.g}^{-1}$ ) e altura de pico ( $>$  que  $1,38 \text{ W.g}^{-1}$ ) devem ser observadas quando se empregarem temperaturas de cristalização próximas a  $15^\circ\text{C}$  e taxa de resfriamento acima de  $1,0 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ .

A Figura 37 apresenta alguns termogramas de fusão que ilustram as diferenças entre as frações obtidas nos ensaios. A Figura 38 apresenta os termogramas de cristalização dessas frações.

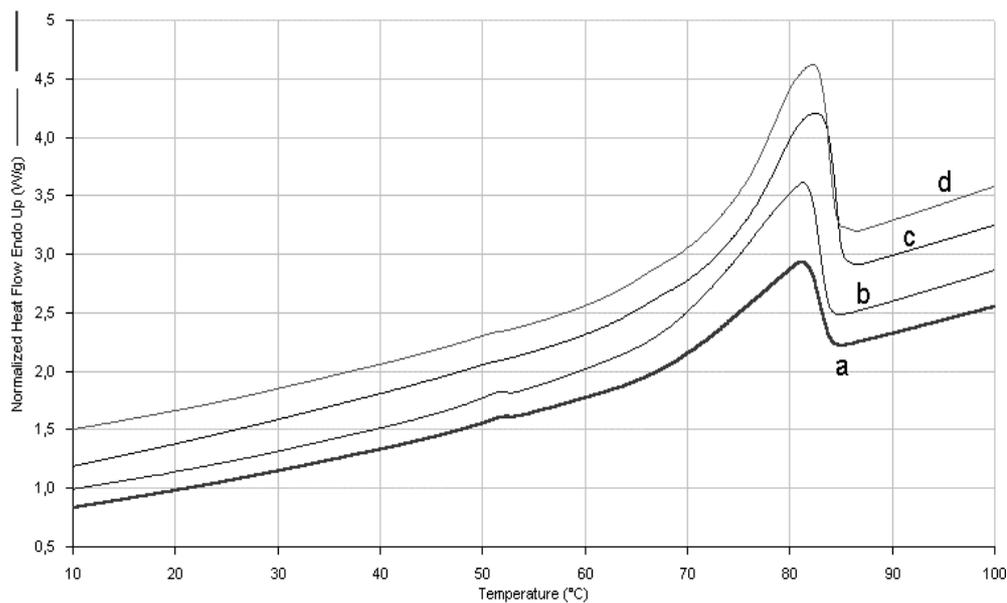


Figura 37. Termogramas de fusão de frações de cera de cana-de-açúcar.

- (a)  $T_c = 5^\circ\text{C}$ ,  $T_x \text{ resfr.} = 0,3^\circ\text{C.min}^{-1}$ , (b)  $T_c = 5^\circ\text{C}$ ,  $T_x \text{ resfr.} = 1,3^\circ\text{C.min}^{-1}$ ,  
(c)  $T_c = 15^\circ\text{C}$ ,  $T_x \text{ resfr.} = 0,3^\circ\text{C.min}^{-1}$ , (d)  $T_c = 15^\circ\text{C}$ ,  $T_x \text{ resfr.} = 1,3^\circ\text{C.min}^{-1}$ .

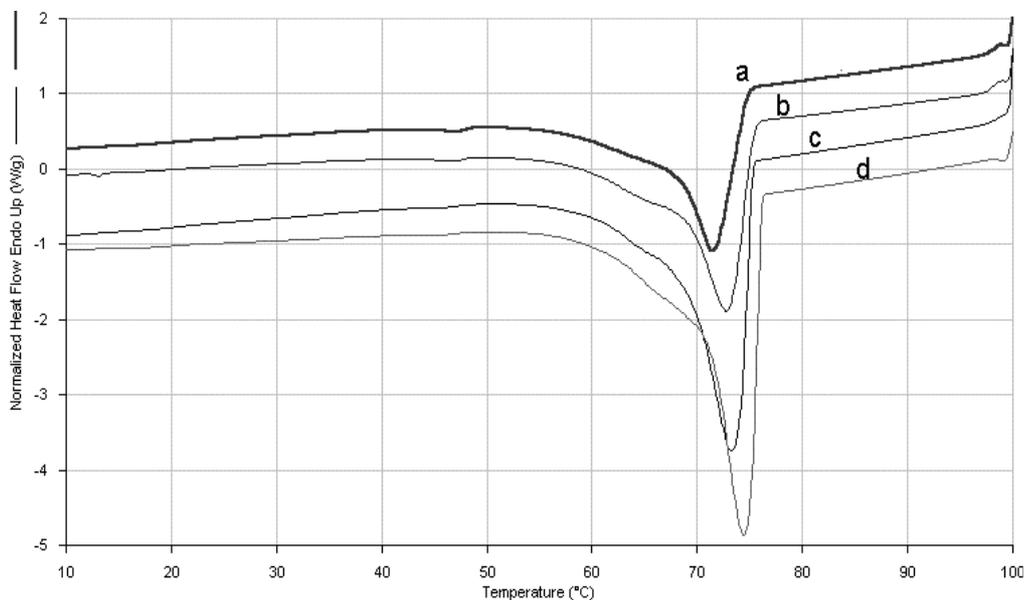


Figura 38. Termogramas de cristalização de frações de cera de cana-de-açúcar.  
 (a)  $T_c = 5^\circ\text{C}$ ,  $T_x \text{ resfr.} = 0,3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , (b)  $T_c = 5^\circ\text{C}$ ,  $T_x \text{ resfr.} = 1,3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  
 (c)  $T_c = 15^\circ\text{C}$ ,  $T_x \text{ resfr.} = 0,3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , (d)  $T_c = 15^\circ\text{C}$ ,  $T_x \text{ resfr.} = 1,3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A análise dos termogramas mostra a influência da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento sobre as propriedades térmicas das frações obtidas. Observa-se, através dos termogramas, que independentemente da taxa de resfriamento, o comportamento térmico das frações analisadas foi muito parecido dentro de cada faixa de temperatura de cristalização. Maiores valores de entalpia, altura de pico e  $T_{onset}$  foram apresentados pelas amostras fracionadas a  $15^\circ\text{C}$ .

Contudo, a endoterma de fusão de uma amostra é afetada pelo tamanho dos cristais formados. No caso do fracionamento de uma gordura, uma

cristalização muito rápida pode levar à formação de um grande número de pequenos cristais. LIU et al. (1994) observaram que misturas de óleo de canola com o sedimento de “winterização” de óleo de canola apresentaram um pico de fusão a 44°C, quando resfriadas à taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>. O pico de fusão dessa amostra resfriada a 0,5 °C min<sup>-1</sup> foi cerca de 48°C. No entanto, os autores não verificaram efeito da taxa de resfriamento em amostras contendo maior proporção de sedimento de “winterização”.

De fato, cristais pequenos tendem a se dissolver com maior facilidade na fase líquida de uma amostra durante o processo de fusão devido à maior área de contato. Por esse motivo, mantendo-se uma mesma temperatura de cristalização, uma fração resultante de um processo de resfriamento rápido tende a apresentar menor ponto de fusão. No entanto, em amostras duras como as frações de cera de cana-de-açúcar obtidas nos ensaios de purificação, esse efeito não foi verificado. Os resultados dos ensaios mostraram que as frações de cera de cana-de-açúcar apresentaram picos de fusão com maior altura e entalpia à medida que a taxa de resfriamento aumentou, dentro da faixa estudada. Esse comportamento concorda com os resultados relatados por LIU et al. (1994) para o comportamento de fusão de cera isolada do sedimento de “winterização” do óleo de canola.

Pode-se supor que, em contraste com outros tipos de lipídios que freqüentemente apresentam várias formas polimórficas, os cristais da cera de cana-de-açúcar são estáveis, não tendendo a sofrer transformações. Por serem mais estáveis, os cristais de cera podem ser separados mais facilmente da fase líquida durante a filtração, mesmo com a utilização de altas velocidades de resfriamento no fracionamento. Os resultados obtidos nos ensaios de purificação ainda podem ser relacionados aos observados por SINGH et al. (1990), que obtiveram cera de arroz a partir do fracionamento estático de uma miscela de óleo de farelo de arroz em hexano. Os autores observaram que à temperatura de cristalização de 5°C, o rendimento em fração sólida foi maior do que a 10°C ou 15°C. Entretanto, em todos casos, a cristalização das ceras ocorreu

predominantemente nas primeiras duas horas, ao passo que o aumento no tempo para 4 a 6 horas de duração promoveu apenas um pequeno aumento não significativo na porcentagem de cera sedimentada.

A velocidade de resfriamento é relacionada ao tempo do fracionamento, que está relacionado à produtividade e ao custo do processo. Assim, se admitir-se como principal objetivo deste processo de purificação a produtividade do processo e a obtenção de uma fração de cera com alto ponto de fusão, a taxa de resfriamento deverá ser definida com base no rendimento e nas propriedades térmicas da fração obtida. Com a diminuição da temperatura de cristalização, os picos de fusão e cristalização tornaram-se mais largos e menos simétricos, com menor altura. Picos estreitos, altos e que requerem mais energia para a transição de fases (entalpia) indicam que os componentes da amostra são de composição homogênea, com propriedades de fusão e formas de cristais similares. Os ensaios realizados permitiram a obtenção de frações com propriedades térmicas muito parecidas com aquelas apresentadas pelas amostras de cera purificadas de cana, cujos resultados foram apresentados e discutidos no Capítulo 4.6. Pode-se concluir, portanto, que frações de cera de alta pureza quanto à composição em classes de lipídios podem ser obtidas através do controle da temperatura de cristalização e da taxa de resfriamento.

Os resultados apresentados confirmam a necessidade da escolha correta das variáveis estudadas. O modelo matemático estabelecido para a determinação da *Tonset* de fusão mostrou-se adequado para a representação do processo dentro das faixas estudadas. De acordo com as superfícies de resposta obtidas, os componentes da cera bruta de cana orgânica com *Tonset* maior que 72°C e altura de pico maior que 1,29 W.g<sup>-1</sup> poderiam ser segregados nos cristais separados utilizando-se temperatura de cristalização entre 14,5°C e 17°C e taxa de resfriamento de 1,0 a 1,5 °C min<sup>-1</sup>.

A validação prática do modelo experimental obtido para a determinação da *Tonset* de fusão foi realizada através de ensaio conduzido sob a seguinte condição: Temperatura de cristalização de 15°C e taxa de resfriamento de 1,5 °C.min<sup>-1</sup>. Obteve-se um rendimento de 55,5% em cera purificada e a *Tonset* do pico de fusão foi de 72,4°C. Comparando o resultado calculado através da utilização do modelo matemático codificado (*Tonset* = 73,1°C) ao resultado obtido experimentalmente, confirma-se a conclusão teórica de que o modelo proposto é preditivo.



## 5. Conclusões

- A extração com solvente mostrou-se um processo tecnicamente viável para a obtenção de cera de tortas de filtro de cana-de-açúcar. O hexano foi o solvente que proporcionou os melhores resultados.
- A origem da torta de filtro de cana-de-açúcar influenciou o rendimento da extração e a qualidade da cera bruta. O maior rendimento em cera bruta (7,11%) foi obtido com a utilização de torta de filtro de cana orgânica.
- No processo de extração, a seleção de faixas ótimas de trabalho (relação solvente:matéria-prima de 13:1 a 15:1, tempo de 5 a 6 horas e tamanho máximo de partícula de 4,0 mm) permitiu a obtenção de um rendimento relativo superior a 95%.
- O processo de purificação apresentado permitiu a obtenção de amostras com parâmetros físico-químicos próximos aos da cera de carnaúba. As ceras purificadas de cana apresentaram alta pureza quanto à composição em classes de lipídios.
- Constatou-se a presença hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) somente na cera bruta de cana queimada. As ceras purificadas não apresentaram contaminação com HPAs.



## Referências Bibliográficas

- ADAMENAS, J. O negócio é fazer cera. **Química e Derivados**, p. 24-29, 1982.
- AMELIO, M.; RIZZO, R.; VARAZINI, F. Separation of stigmata-3,5-diene, squalene isomers, and wax esters from olive oils by single high-performance liquid chromatography run. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.4, p.527-530, 1998.
- AMELIO, M.; RIZZO, R.; VARAZINI, F. Separation of wax esters from olive oils by high-performance liquid chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.8, p.793-796, 1993.
- AOCS – AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommend Practices**. 4. ed. Champaign: AOCS Press. 1996
- AZZAM, A. M. Further investigations on cane wax refining and bleaching. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.88, n.5, p.191-194, 1986.
- AZZAM, A. M. Separation and analysis of wax from Egyptian sugar cane filter press cake. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.86, n.6, p.247-250, 1984.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 299p.
- BASSON, I.; REYHNARD, E. C. An investigation of the structures and molecular dynamics of natural waxes: II. Carnauba wax. **Journal of Phys. D: Applied Phys.**, v.21, p.1429-1433, 1988.
- BELAVADI, V. K.; BHOWMICK, D. N. An investigation of rice bran oil tank setting. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.65, n.2, p.241-245, 1988.

- BENNET, H. **Commercial Waxes**. 2 ed. New York: Chemical Publishing, 1956. 688p.
- BERNARDINI, E. Batch and continuous solvent extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.53, n.6, p.275-278, 1976.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, S. W.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters – an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1978.
- BRIMBERG, U. I.; WRETENSJO, I. C. Rapid method for determination of wax in sunflowerseed oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.56, n.9, p.857-860, 1979.
- BUTTAR, G. S.; PARMAR, S. S.; SINGH, K. An efficacious protocol of wax extraction from filter cake of sugar industry and its chemical analysis. In: 61<sup>ST</sup> ANNUAL CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, New Delhi, 1999. Proceedings. New Delhi: The Sugar Technologists' Association of India, 1999. p. 40-44.
- CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22., n.1, p. 49-53, 2002.
- CARNAÚBA resiste ao domínio do sintético. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 16 de maio de 2000. Agrofólia, p. f1, f4.
- CARVALHO, L. C. C. Cana pede demanda. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.16, n.3, p.6-7, 1998.
- CEBULA, D.J.; SMITH, K.W. Differential scanning calorimetry of confectionery fats. Pure triglycerides: Effects of cooling and heating rate variation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.8, p.591-595, 1991.

- CHRISTIE, W. W. **Lipid Analysis – Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids**. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 207p.
- CHRISTIE, W. W. **Waxes: Structure, Composition, Occurrence and Analysis**. Dundee: Scottish Crop Research Institute, 2003. Disponível na internet: [www.lipid.co.uk](http://www.lipid.co.uk)
- COUPLAND, K.; NICHOLS, J. A. Lipids: their use in personal care products. In: GUNSTONE, F. D.; PADLEY, F. B. **Lipid Technologies and Applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. Chap. 26, p.685-709.
- CURRALERO, I. C. B. **Estudo de sistema bifásico duplo estágio para produção de dextrana**. 2000. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- DEFFENSE, E. Fractionation of palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.62, n.2, p.376-385, 1985.
- DIMICK, P.S.; MANNING, D.M. Thermal and compositional properties of cocoa butter during static crystallization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.64, n.5, p. 1663-1669, 1987.
- DOMÍNGUES, E.; HEREDIA, A. Waxes: a forgotten topic in lipid teaching. **Biochemical Education**, v.26, p.315-316, 1998.
- FARAG, R. S.; HASSAN, M. N.; ALI, H. F. M. Bees wax and its unsaponifiables as natural preservative for butter and cottonseed oils. **Grasas y Aceites**, v.44, n.3, p.183-189, 1993.
- FRANCO, A. **Combustão sazonal da cana-de-açúcar como uma fonte de hidrocarbonetos pouco voláteis**. 2001. 94p. Tese (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Araraquara.

- GAMEZ, R.; RODEIRO, I.; FERNANDEZ, I.; ACOSTA, P. L. Preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: mixture of very long chain fatty acids. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v.22, p.175-181, 2002.
- GONÇALVES, L. V. F. **Caracterização dos lipídios e outros constituintes de tortas-de-filtro de usinas açucareiras do município de Campos**. 1998. 145p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.
- GRACIEN, J.; AREVALO, G. Wax composition of sunflower seed oil. **Grasas y Aceites**, v.32, n.1, p.1-5, 1981.
- GRAILLE, J.; PINA, M.; PIOCH, D. Routine analysis of jojoba wax fatty acids and alcohols by single column capillary GC. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, n.1, p.111-116, 1986.
- GREENER-DONHOWE, I.; FENNEMA, O. Water vapor and oxygen permeability of wax films. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.9, p.867-873, 1993
- GROMPONE, M. A.; AROZTEGUI, B.; KALAMAR, C.; BORREA, A. Cristalización fraccionada de grasa vacuna disuelta em acetona o hexano. **Grasas y Aceites**, v.40, n.4-5, p.246-253, 1989.
- GROVA, N.; FEIDT, C.; CREPINEAU, C.; LAURENT, C.; LAFARGUE, P. E.; HACHIMI, A.; RYCHEN, G. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons levels in milk collected near potential contamination sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.16, p.4640-4642, 2002.
- GUNSTONE, F. D.; PADLEY, F. B. **Lipid Technology and Applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. 834p.

GUTFINGER, T.; LETAN, A. Studies of unsaponifiables in several vegetable oils. **Lipids**, v.9, n.9, p.658-663, 1974.

HAMILTON, R. J. Analysis of Waxes. In: HAMILTON, R. J. **Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions**. Dundee: Oily Press, 1995. Chap.6, p.311-342.

HENON, G. Dosage des cires dans les huiles de tournesol par chromatographie. **Revue Française des Corps Gras**, v.33, n.12, p.475-482, 1986.

HERNANDEZ, E.; BAKER, R. A. Candelilla wax emulsion, preparation and stability. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p.1392-1387, 1991.

HU, X.; DAUN, J. K.; SCARTH, R. Characterization of wax sediments in refined canola oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.5, p.535-537, 1993.

HWANG, K.; CUPPETT, S. L.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Properties, composition, and analysis of grain sorghum wax. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.79, n.6, p.521-527, 2002.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Polynuclear Aromatic Compounds. **IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data**, v. 32, Dezembro, 1983. Lyon, France.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2003. Disponível na internet: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>

IRVINE, J. E. Sugar Cane. In: MEADE, G. P.; CHEN, J. P. C. **Cane Sugar Handbook**. New York: John Wiley, 1977. Chap. 1, p.3-14.

- ITO, S.; SUZUKI, T.; FUJINO, Y. Wax lipid in rice bran. **Cereal Chemistry**, v.60, n.3, p.252-253, 1983.
- JOH, Y. G.; BRECHANY, E. Y.; CHRISTIE, W. W. Characterization of wax esters in the roe oil of amber fish *Seriola aureovittata*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.72, n.6, p.707-713, 1995.
- JOHANSSON, A. The content and composition of sterols and sterol esters in sunflower and poppy seed oils. **Lipids**, v.14, n.3, p.285-291, 1979.
- JOHNSON, L. A.; LUSAS, E. W. Comparison of alternative solvents for oil extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.60, n.2, p.229-242, 1983.
- KALIL, S. J. **Estudo da recuperação e purificação de inulinase utilizando coluna de leito expandido**. 2000. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- KAWANISHI, K.; AOKI, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUNOBU, A. Free primary alcohol in oils and waxes from germs, kernels and other components of nuts, seeds, fruits and cereals. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.11, p.869-872, 1991.
- KARNOFSKY, G. The theory of solvent extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.26, n.10, p.564-569, 1949.
- KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Response Surfaces: Design and Analyses**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1987. 510 p.
- KIOSSEOGLOU, V.; BOSKOU, D. Separation and fatty acid composition of steryl and wax esters in hexane extracts of sunflower seed, soybeans and tomato seeds. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technology**, v.23, n.4, p.340-342, 1990.

- KOŁODZIEJCZYK, P. POS – Canola Council of Canada: Identification of waxes in canola waxes. 2000.
- LARIOS, M. E.; PÉREZ, M. D.; MARRERO, R. M. Estudio de la distribución de la cera en las distintas partes de la cana. **Centro Azúcar**, v.20, n.3, p.6-10, 1993.
- LI, S.; PARISH, E. J. The chemistry of waxes and sterols. In: AKOH, C.; MIN, D. B. **Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. Chap. 4, pp. 89-114.
- LIU, H.; BILIADERIS, C.G.; PRZYBYLSKI, R.; ESKIN, N.A.M. Effects of crystallization conditions on sedimentation in canola oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n.4, p.409-415, 1994.
- LIU, H.; BILIADERIS, C.G.; PRZYBYLSKI, R.; ESKIN, N.A.M. Phase transitions of canola oil sediment. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.5, p.441-448, 1993
- LIU, H.; BILIADERIS, C.G.; PRZYBYLSKI, R.; ESKIN, N.A.M. Physical behaviour and composition of low- and high- fractions of sediment in canola oil. **Food Chemistry**, v.53, p.35-41, 1995.
- LIU, H.; PRZYBYLSKI, R.; DAWSON, K.; ESKIN, N. A. M.; BILIADERIS, C. G. Comparison of the composition and properties of canola and sunflower oil sediments with canola hull lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, n.4, p.493-498, 1996.
- LUCAS, W. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas à manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. 2001. 195p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- LUCCHESI, A. A Processos fisiológicos da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*). **Boletim técnico, ESALQ/CENA**, n.7, PCLQ/USP, Piracicaba. p.1-3. 1995. 50p.
- MARIANI, C.; FEDELI, E. Individuazione di oli di estrazione in quelli di pressioni. Nota 1. **Rivista Italiana Sostanze Grasse**, v.63, n.1, p.3-17, 1986.
- MAS, R.; RIVAS, P.; IZQUIERDO, J. E.; HERNANDEZ, R.; FERNANDEZ, J.; ORTA S. D.; ILLNAIT, J.; RICARDO, Y. Pharmacoepidemiologic study of policosanol. **Current Therapeutic Reserach - Clinical and Experimental**, v. 60, n.8, p.458-467, 1999.
- MATTHIES, L. Natural montan wax and its raffinates. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.103, n.2, p.239-248, 2001.
- MENENDEZ, R.; FRAGA, V.; AMOR, A. M.; GONZALES, R. M.; MAS, R. Oral administration of policosanol inhibits in vitro copper ion-induced rat lipoprotein peroxidation. **Physiology & Behavior**, v.67, n.1, p.1-7, 1999.
- MENENDEZ, R.; MAS, R.; AMOR, A. M.; LEDON, N.; PEREZ, J.; GONZALES, R. M.; RODEIRO, I.; ZAYAS, M.; JIMÉNEZ, S. Inhibition of rat lipoprotein peroxidation by the oral administration of D003, a mixture of very long-chain saturated fatty acids. **Canadian Journal of Physiological Pharmacology**, v.80, n.1, p.13-21, 2002.
- MIWA, T. K. Structural determination and use of jojoba oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.61, n.2, p.407-410, 1984
- MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v.27, p. 229-245, 1999

- MORRISON, W. H. A rapid, effective method for the reduction of waxes in sunflowers seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.59, n.12, p.519-520, 1982a.
- MORRISON, W. H. Rapid determination of wax in sunflower seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.59, n.7, p.284-285, 1982b.
- MOULTON S., K. J. Turbidimetric measurement of wax in sunflower oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.65, n.3, p.367-368, 1988.
- NASSU, R. T. **Estudo do comportamento térmico de óleos e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC)**. 1994. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v.11, n.5, p.453-457, 2000.
- NUISSIER, G.; BOURGEOIS, P.; GRIGNON-DUBOIS, M.; PARDON, P.; LESCURE, M. H. Composition of sugarcane waxes in rum factory wastes. **Phytochemistry**, v.61, p.721-726, 2002. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/phytochem>
- O'KEEFE, S. F. Nomenclature and classification of lipids. In: AKOH, C.; MIN, D. B. **Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. Chap. 1, pp. 1-36.
- OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidants isolated from *Eucalyptus* leaf waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, n.5, p.777-780, 1985.
- PATERSON, E.; AMADO, R. Simplified method for the simultaneous gas chromatographic determination of fatty acid composition and cholesterol in

- food. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 30, n.2, p.202-209, 1997.
- PATURAU, J. M. **By-products of the Cane Sugar Industry**. New York: Elsevier Publishing Company, 1989. 274p.
- PEGEL, K. H. The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. **South African Journal of Science**, v.93, n.6, p.263-268, 1998.
- PEREIRA, A. S.; NORSELL, M.; CARDOSO, J. N.; AQUINO NETO, F. R. Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.11, p.5226-5230, 2000.
- PEREIRA, A. S.; PINTO, A. C.; CARDOSO, J. N.; AQUINO NETO, F. R.; RAMOS, M. F. S.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; SANTOS, E. P. Application of high temperature high resolution gas chromatography to crude extracts of propolis. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.21, p.513-518, 1998.
- PERKINS, E. G. Nomenclature and classification of lipids. In: PERKINS, E. G. **Analysis of Fats, Oils and Lipoproteins**. Champaign: AOCS Press, 1993. Chap.1, pp.1-19.
- PHUKAN, A. C., BORUAH, R. K. Extraction and evaluation of microcrystalline wax from press mud waste of the sugar industry. **Separation and Purification Technology**, v.17, p.189-194, 1999. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/seppur>
- PINA, M.; OZENNE, C.; LAMBERET, G.; MONTET, D.; GRAILLE, J. Contribution of Grignard reagents in analysis of short-chain fatty acids. In: SEBEDIO, J. L.; PERKINS, E. G. **New Trends in Lipid and Lipoprotein Analysis**. Champaign: AOCS Press, 1995. Chap.18, p.242-249.

- PINA, M.; PIOCH, D.; GRAILLE, J. Rapid analysis of jojoba wax fatty and alcohols after derivatization using Grignard reagents. **Lipids**, v.22, n.5, p.358-361, 1987.
- PIOCH, D.; PINA, M.; GRAILLE, J. Acides et alcools gras de la cire de jojoba: analyse simple et rapide. **Revue Française des Corps Gras**, v.33, n. 3, p.319-321, 1986.
- PIOMBO, G; MOREAU, J. Rapport de stage CIRAD-AMIS: Mise au point d'une methode rapide et directe de l'evaluation des HAP dans les lipides alimentaires. Montpellier: CIRAD-AMIS, 2000-2001.
- PRZYBYLSKI, R.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Formation and partial characterization of canola oil sediment. . **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n.10, p.1009-1015, 1993.
- RAMAKRISHNA, P.; VENKATESH, K. V. L.; POORNIMA, T. C.; MANOHAR, B. Effect of wax on flow properties of rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.64, n.6, p.859-861, 1987.
- ROSSEL, J. B.;PRITCHARD, J. R. L. **Analysis of Oilseeds, Fats and Fatty Foods**. London: Elsevier Applied Science, 1991. 558p.
- SAGUY, I. S.; SHANI, A.; WEINBERG, P.; GARTI, N. Utilization of jojoba oil for deep-fat frying of foods. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.29, n.5-6, p.573-576, 1996.
- SCAVARIELLO, E. M. S. **Modificação química e enzimática da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz**. 2002. 143p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- SERRA, G. E.; PUPIN, A. M.; TOLEDO, M. C. F. Ensaio preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Boletim da SBCTA**, v.29, n.2, p.134-137, 1995.
- SINGH, R. P.; GUHA, L.; MAHESHWARI, P. N.; VASISHTHA, A. K. Isolation of waxes from ricebran oils. In: APPLEWHITE, T. H. (ed). **World Conference on Oleochemicals Proceedings, Kuala Lumpur**, Malásia. Champaign: AOCS, 1990. p. 315-318.
- SONNTAG, N. O. V. Structure and composition of fats and oils. In: SWERN, D. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products - Vol. 1**. New York: John Wiley & Sons, 1979. p. 1-98.
- STUCHLIK, M.; ZAK, S. Vegetable lipids as components of functional foods. **Biomedical Papers**, v.146, n.2, p.3-10, 2002.
- SZAFRANEK, B.; MALINSKI, E.; SZAFRANEK, J. The sequisterperne composition of leaf cuticular neutral lipids of tem polish varieties of *Solanum tuberosum*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, n.4, p.588-592, 1998.
- THOMAS III, A. E. Fractionation and winterization: processes and products. In: APPLEWHITE, T. H. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products - Vol. 3**. New York: John Wiley & Sons, 1985. Chap. 1, p. 1-39.
- THOMPSON, D. R. Response surface experimentation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.6, n.3, p.155-188, 1982.
- TONNET, M. L.; DUNSTONE, R. L.; SHANI, A. A rapid micromethod for the quantitative analysis of jojoba wax and its components. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.61, n.6, p.1061-1064, 1984.
- TULLOCH, A. P. Composition of some natural waxes. **Cosmetic and Perfumery**, v.89, n.11, p.53-54, 1974.

- TURKULOV, J.; DIMIC, E.; KARLOVIC, D.; VUKSA, V. The effect of temperature and wax content on the appearance of turbidity in sunflowerseed oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.63, n.10, p.1360-1363, 1986.
- WAKELYN, P. J. Acetone: an environmentally preferable choice for oilseed extraction? **Inform**, v.12, n.9, p.887-893, 2001.
- WANG, L.; ANDO, S.; ISHIDA, Y.;OHTANI, H.; TSUGE, S.; NAKAYAMA, T. Quantitative and discriminative analysis of carnauba waxes by reactive pyrolysis-GC in the presence of organic alkali using a vertical microfurnace pyrolyzer. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 58-59, p. 525-537, 2001. Disponível na internet: [www.elsevier.com/locate/jaap](http://www.elsevier.com/locate/jaap)
- WARTH, A. H. **The Chemistry and Technology of Waxes**. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1947. 519p.
- WELLER, C. L.; GENNADIOS, E.; SARAIVA, R. A. Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 31, n.3, p.279-285, 1998.
- YOON, S. H.; RHEE, J. S. Composition of waxes from crude rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.59, n.12, p.561-563, 1982.