

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

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO PARA A
OBTENÇÃO DE POLICOSANOL A PARTIR DE CERA DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*)**

Cláudia Helena Ribeiro do Rozário

Orientador: Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

CAMPINAS – São Paulo

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R817e Rozário, Cláudia Helena Ribeiro do
Desenvolvimento de um processo para a obtenção de policosanol a partir de cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) / Cláudia Helena Ribeiro do Rozário. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Daniel Barrera Arellano
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ceras. 2. Cana-de-açúcar. 3. Torta de filtração. 4. Álcoois graxos. 5. Policosanol. 6. Saponificação. I. Barrera-Arellano, Daniel. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Título em inglês: Development of a process for obtaining policosanol from sugarcane wax (*Saccharum officinarum*)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Waxes, Sugarcane, Filter cake, Fatty alcohols, Policosanol, Saponification

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Daniel Barrera Arellano
Caroline Joy Steel
Thais Maria Ferreira de Souza Vieira
Walter Esteves

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano
FEA – UNICAMP

Prof^a Dr^a Caroline Joy Steel
FEA – UNICAMP

Prof^a Dr^a Thais Maria Ferreira de Souza Vieira
ESALQ – USP

Prof. Dr. Walter Esteves
FEA – UNICAMP

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Ceras.....	3
2.1.1. Características gerais e definições.....	3
2.1.2. Classificação das ceras.....	4
2.1.3. Principais componentes encontrados nas ceras	5
2.1.4. Ceras de superfícies de plantas.....	6
2.1.5. Aplicações e usos para as ceras naturais e sintéticas	7
2.2. Cana-de-açúcar.....	8
2.2.1. Cera de cana-de-açúcar.....	10
2.2.1.1. Obtenção da cera de cana-de-açúcar	13
2.2.1.1.1. Antecedentes.....	13
2.2.1.1.2. Extração da cera de cana-de-açúcar.....	13
2.2.1.1.3. Purificação da cera de cana-de-açúcar	16
2.2.1.1.4. Clarificação da cera de cana-de-açúcar	19
2.3. Policosanol	21
2.3.1. Histórico	21
2.3.2. Fontes de álcoois alifáticos primários.....	22
2.3.3. Métodos para obtenção de misturas de álcoois de diversas fontes	22
2.3.4. Obtenção de policosanol de cera de cana-de-açúcar	25

2.3.5. Determinação do conteúdo de álcoois graxos e análises físico-químicas e mecânicas	28
2.3.6. Policosanol e saúde	29
2.3.6.1. Efeitos farmacológicos atribuídos ao policosanol	30
2.3.6.2. Mecanismos de ação do policosanol	31
2.3.6.3. Uso do policosanol em populações de pacientes especiais	33
2.3.6.3.1. Pacientes com distúrbios hepáticos e com hipercolesterolemia tipo II	33
2.3.6.3.2. Pacientes com hipertensão	33
2.3.6.3.3. Pacientes com diabete	33
2.3.6.3.4. Pacientes idosos	34
2.3.6.4. Estudo comparativo entre policosanol e outras drogas redutoras de lipídios	34
2.3.6.5. Outros efeitos farmacodinâmicos atribuídos ao policosanol	36
2.3.6.6. Dosagem recomendada e contra-indicações	37
2.3.6.7. Toxicidade e perfil de segurança clínica	37
3. Material, Métodos e Procedimento Experimental	39
3.1. Material	39
3.1.1. Matéria-prima	39
3.1.2. Reagentes e insumos de processo	39
3.1.3. Equipamentos	40
3.2. Métodos	41
3.2.1 Métodos analíticos	41
3.2.2. Composição em álcoois graxos	44
3.3. Procedimento experimental	48
3.3.1. Preparação da amostra de cera bruta	48
3.3.2. Purificação da cera bruta – método do álcool etílico a quente	48
3.3.3. Caracterização das matérias-primas (cera bruta e cera purificada)	51
3.3.4. Estudo do processo de produção de policosanol em nível laboratorial	51

3.3.4.1. Testes preliminares – reprodução da metodologia proposta nas patentes.....	51
3.3.4.2. Estudo das etapas envolvidas no processo proposto nas patentes e desenvolvimento de procedimentos alternativos	54
3.3.4.2.1. Etapa de saponificação	54
3.3.4.2.1.1. Otimização da etapa de saponificação	55
3.3.4.2.1.2. Determinação das condições mais favoráveis da reação de saponificação.....	58
3.3.4.2.2. Etapa de separação da mistura de álcoois.....	58
3.3.4.2.2.1. Separação da mistura de álcoois utilizando-se extração sólido-líquido	58
3.3.4.2.2.2. Separação da mistura de álcoois utilizando-se filtrações a quente.....	59
3.3.4.2.2.3. Separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina...	60
3.3.4.2.2.4. Separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina e etanol (extração sólido-líquido).....	60
3.3.4.2.2.5. Separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina e etanol	61
3.3.4.3. Processo definido para obtenção do “policosanol 50”	61
3.3.4.4. Purificação dos álcoois graxos - obtenção do “policosanol 90”	63
4. Resultados e Discussão	64
4.1. Preparação da cera bruta.....	64
4.2. Purificação da cera bruta.....	66
4.3. Caracterização das matérias-primas (cera bruta e cera purificada)...	66
4.3.1. Índices analíticos	67
4.3.2. Composição em álcoois graxos.....	70
4.4. Estudo do processo de produção de policosanol em nível laboratorial.....	75
4.4.1. Testes preliminares – reprodução da metodologia das patentes	75

4.4.2. Estudo das etapas envolvidas no processo proposto nas patentes para obtenção do policosanol e desenvolvimento de procedimentos alternativos.....	77
4.4.2.1. Etapa de saponificação.....	77
4.4.2.1.1. Otimização da reação de saponificação	78
4.4.2.1.2. Determinação das condições mais favoráveis da etapa de saponificação.....	83
4.4.2.2. Etapa de separação da mistura de álcoois graxos da cera purificada saponificada	85
4.4.2.2.1. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se extração sólido-líquido.....	85
4.4.2.2.2. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se filtração a quente	87
4.4.2.2.3. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se solução salina.....	88
4.4.2.2.4. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se solução salina e etanol (extração sólido-líquido)	90
4.4.2.2.5. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se solução salina e etanol	91
4.4.3. Processo definido para obtenção do “policosanol 50”	92
4.4.4. Purificação do “policosanol 50” para obtenção do “policosanol 90”	94
5. Conclusões	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes encontrados nas ceras de superfícies de plantas	7
Tabela 2. Composição química da cana-de-açúcar	9
Tabela 3. Composição típica de torta de filtração de cana-de-açúcar (base seca)	12
Tabela 4. Rendimentos em cera refinada, óleo e resina obtidos em uma planta de refino utilizando etanol.....	17
Tabela 5. Características das ceras purificadas de cana-de-açúcar orgânica e queimada e das ceras comerciais de carnaúba e abelha.....	18
Tabela 6. Teor de octacosanol em diferentes amostras de cera de cana-de-açúcar	27
Tabela 7. Composição em álcoois graxos de diferentes amostras de ceras de cana-de-açúcar	28
Tabela 8. Relação de cera e soluções de NaOH (aquosas e alcoólicas), testadas durante os ensaios de saponificação da cera purificada	55
Tabela 9. Variáveis independentes e seus níveis de variação para o planejamento experimental da reação de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar	57

Tabela 10. Delineamento experimental do planejamento fatorial completo aplicado ao processo de otimização da reação de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar	57
Tabela 11. Rendimento em cera purificada e resina obtidos no processo de purificação da cera bruta (base seca), em escala piloto, utilizando o processo do álcool a quente.....	65
Tabela 12. Características físico-químicas das ceras de cana-de-açúcar bruta e purificada.....	67
Tabela 13. Composição em álcoois graxos totais das amostras de cera de cana-de-açúcar bruta e purificada pelo método do álcool a quente	72
Tabela 14. Teor de octacosanol encontrado nas amostras de cera de cana-de-açúcar bruta e purificada	75
Tabela 15. Intervalo de tempo decorrido desde a adição da solução de álcali até a interrupção da agitação do sistema, durante a reação de saponificação da cera bruta	77
Tabela 16. Rendimentos (%) das misturas de álcoois e teor em álcoois (pureza) (%) obtidos no estudo de otimização da reação de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar	80
Tabela 17. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento (%) do processo de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar ...	81
Tabela 18. Análise de variância (ANOVA) para o rendimento (%) do processo de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar	82

Tabela 19. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o teor de álcoois (pureza) (%) dos produtos resultantes do processo de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar	84
Tabela 20. Rendimentos (%) das misturas de álcoois, obtidos em 3 ensaios, após 10 horas de extração sólido-líquido.....	85
Tabela 21. Rendimentos (%) das misturas de álcoois obtidos com 1, 2 e 3 extrações sólido-líquido	86
Tabela 22. Rendimentos (%) das misturas de álcoois utilizando-se o processo de filtração a quente	87
Tabela 23. Rendimentos (%) das misturas de álcoois e teores de álcoois (pureza) (%) obtidos nos ensaios de extração utilizando-se solução salina	89
Tabela 24. Rendimentos (%) e teores de álcoois (pureza) (%) dos produtos obtidos utilizando-se 1 e 2 extrações sólido-líquido do material resultante da etapa com solução salina	90
Tabela 25. Rendimento médio (%) e teor de álcoois (pureza) (%) obtidos em três ensaios de separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina e etanol	91
Tabela 26. Composição em álcoois graxos do “policosanol 50”, obtido após saponificação da cera purificada (nas condições mais favoráveis) e separação da mistura de álcoois utilizando solução salina e etanol	93
Tabela 27. Composição em álcoois graxos do “policosanol 90”, obtido após purificação do “policosanol 50” com acetona, e composição e especificação do Lestanol utilizado como padrão	95

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Esquema de derivatização da cera com o reagente de Grignard	46
Figura 2: Esquema de purificação da cera bruta conforme metodologia proposta por MCLOUD.....	50
Figura 3. Esquema dos testes preliminares, realizados para obtenção da mistura de álcoois, conforme a metodologia proposta nas patentes de LAGUNA GRANJA et al. (U.S. 5.663.156, 1997 e U.S. 5.856.316,1999.....	53
Figura 4. Fluxograma do processo de separação dos álcoois graxos de cera purificada saponificada para obtenção do “policosanol 50”	62
Figura 5. Curva padrão para a quantificação dos álcoois presentes nas amostras de cera de cana-de-açúcar.....	70
Figura 6. Verificação da eficiência da reação de derivatização utilizando-se o reagente de Grignard	71
Figura 7. Cromatograma da composição em álcoois graxos da cera bruta de cana-de-açúcar após derivatização utilizando-se o reagente de Grignard	73
Figura 8. Cromatograma dos álcoois graxos totais da cera purificada de cana-de-açúcar após derivatização utilizando-se o reagente de Grignard.....	74
Figura 9. Cromatograma dos álcoois graxos totais do “policosanol 50”	94

Figura 10. Cromatograma dos álcoois graxos totais do “policosanol 90”96

Figura 11. Cromatograma em álcoois do Lestanol utilizado como padrão97

RESUMO

A cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), extraída da torta de filtração, um subproduto da indústria sucro-alcooleira, tem sido uma matéria de interesse não somente pela sua aplicação industrial como alternativa para as ceras de carnaúba, abelha e sintéticas, mas também pela sua composição química. A cera de cana-de-açúcar é uma fonte natural de álcoois alifáticos primários de cadeia longa, com 24 a 34 átomos de carbono, com predominância do octacosanol. Essa mistura de álcoois de alto peso molecular, denominada “policosanol”, tem chamado a atenção pelas suas propriedades farmacológicas, sendo comercializada industrialmente como componente ativo em diversas formulações com efeitos anti-plaquetários, anti-trombóticos e redutores de colesterol. Neste trabalho, foram estudadas as etapas envolvidas no processo de obtenção de uma mistura de álcoois a partir de cera de cana-de-açúcar, compostas de (1) purificação da cera bruta de cana-de-açúcar pelo método do álcool a quente; (2) saponificação da cera purificada com NaOH, na presença de etanol como solvente; (3) separação da mistura de álcoois da cera saponificada, utilizando solução salina e etanol, para obtenção do produto denominado “policosanol 50” e, (4) purificação com acetona do produto obtido em (3), para obtenção do produto denominado “policosanol 90”. Como a reação de saponificação pode interferir no rendimento do composto de interesse, foram aplicadas técnicas de planejamento experimental nesta etapa e, de acordo com os resultados obtidos, novos testes foram realizados para se determinar as condições mais favoráveis para a reação. A proporção cera:solução de NaOH foi mantida em 1:1 (p:v) e, com este parâmetro fixado, as condições determinadas para a reação de saponificação foram: concentração da solução alcoólica de NaOH de 2M, temperatura de 80°C e tempo de 15 minutos. Nestas condições, o produto denominado “policosanol 50” apresentou um rendimento de 55% e uma pureza em álcoois de 50% e o produto denominado “policosanol 90” apresentou um rendimento de 25,7% e uma pureza em álcoois de 92,3%.

Palavras-chave: cera de cana-de-açúcar, torta de filtração, purificação com etanol, álcoois graxos, saponificação, separação da mistura de álcoois, policosanol.

SUMMARY

Sugarcane wax (*Saccharum officinarum*), extracted from filter cake, a by-product of the sugar and alcohol industry, has been a material of interest, not only for its industrial application, as an alternative to “carnaúba” wax, bees wax and synthetic waxes, but also for its chemical composition. Sugarcane wax is a natural source of long-chain primary aliphatic alcohols, with 24 to 34 carbon atoms, with a predominance of octacosanol. This mixture of high molecular weight alcohols called policosanol, has been investigated due to its pharmacological properties, being industrially commercialized as an active component in various formulations, with anti-platelet, anti-trombotic and cholesterol-reducing effects. In this work, the stages involved in the process of obtaining a mixture of alcohols from sugarcane wax, composed of (1) purification of the raw sugarcane wax by the hot alcohol method; (2) saponification of the purified wax with NaOH in the presence of ethanol as solvent; (3) separation of the mixture of alcohols in the saponified wax using a salt solution and ethanol to obtain the product called “policosanol 50”; and, (4) purification with acetone of the product obtained in (3), to obtain the product called “policosanol 90”, were studied. As the saponification reaction can interfere in the yield of the composite of interest, experimental planning techniques were applied in this stage and, in accordance with the results obtained, new tests were conducted to determine the most favorable reaction conditions. The proportion wax:NaOH solution was maintained at 1:1 (w:v) and, with this parameter fixed, the conditions for the saponification reaction were: concentration of the NaOH alcoholic solution of 2M, temperature of 80°C and time of 15 minutes. Under these conditions, the product denominated “policosanol 50” presented a yield of 55% and a purity in alcohols of 50%, and the product called “policosanol 90” presented a yield of 25.7% and a purity in alcohols of 92.3%.

Key words: sugarcane wax, filter cake, purification with ethanol, fatty alcohols, saponification, separation of the mixture of alcohols, policosanol.

1. INTRODUÇÃO

O interesse pela cera de cana-de-açúcar, extraída das tortas de filtração, um subproduto da indústria sucro-alcooleira, tem sido intensificado nos últimos anos devido não somente à sua aplicação técnica como alternativa para as ceras de carnaúba, abelha e sintéticas, mas também pela sua composição química (TAYLOR, 2000).

A cera de cana-de-açúcar é uma fonte natural de álcoois alifáticos primários de cadeia longa, com 24 a 34 átomos de carbono, com predominância do octacosanol (LAGUNA GRANJA et al., 1997; 1999; BRAVO et al., 1996).

Esta mistura de álcoois, denominada “policosanol”, tem chamado a atenção pelas suas propriedades farmacológicas específicas, sendo comercializada industrialmente como componente ativo em diversas formulações, com efeitos anti-plaquetário, anti-isquêmico, anti-trombótico e redutor de colesterol (GOUNI-BERTHOLD & BERTHOLD, 2002).

Os álcoois graxos, livres e esterificados, presentes na cera de cana de açúcar, compõem grande parte da fração insaponificável e podem ser recuperados após saponificação da cera com álcali, na presença de um solvente adequado (WARTH, 1947). De acordo com VIEIRA (2003), o teor de álcoois totais está na faixa de 20% a 30%, em média, dependendo da cera, se bruta ou purificada, respectivamente.

Diversos autores têm estudado a mistura de álcoois alifáticos de cadeia longa, obtida a partir da cera de cana-de-açúcar, com o objetivo de conhecer sua composição e características fundamentais. LAGUNA GRANJA et al. (1997; 1999) desenvolveram um processo em que a cera de cana, bruta ou purificada, foi exaustivamente saponificada com álcali, os álcoois foram separados por um processo de extração sólido-líquido e posteriormente purificados por cristalização, utilizando solventes adequados.

O Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar e também um grande exportador mundial de açúcar (CARVALHO, 1998) e, considerando o conteúdo de cera presente na cana que pode ser extraída a partir das tortas de filtro (0,0725%) (PATURAU, 1969), o Brasil pode ser considerado um potencial fornecedor deste produto, obtido a partir de um subproduto da indústria sucroalcooleira.

Neste trabalho foram estudadas as condições para obtenção do policosanol a partir de cera purificada de cana-de-açúcar, envolvendo as etapas de purificação da cera bruta pelo processo do álcool a quente e posterior saponificação e separação da mistura de álcoois da cera saponificada.

Como a reação de saponificação pode interferir no rendimento da reação e no conteúdo do composto de interesse, foram aplicadas técnicas de planejamento experimental para se determinar as condições mais favoráveis desta etapa. Nas fases subseqüentes, de extração e purificação da mistura de álcoois, foram testados vários solventes e processos, objetivando buscar o maior rendimento e pureza do produto final.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ceras

2.1.1. Características gerais e definições

O termo cera, “wax” em inglês, é derivado do termo anglo-saxão “weax”, que foi usado para descrever o material proveniente dos favos de mel. Por similaridade, qualquer material de aspecto semelhante encontrado em plantas, também era chamado de cera. Atualmente, o termo tem um significado mais amplo, englobando várias substâncias sólidas ou líquidas encontradas na natureza, incluindo os componentes isolados destes produtos, cuja aparência ou propriedades se assemelham à cera de abelha, independente de sua origem ou método de obtenção. Diversos compostos sintéticos, que não são ceras sob o ponto de vista de composição química, mas possuem características físicas semelhantes, também estão incluídos, devido à sua aplicação técnica como substitutos das ceras (WARTH, 1947).

Para os requerimentos da indústria, as definições físicas e técnicas são as preferidas e, neste contexto, a descrição que melhor reflete esta realidade é a da Sociedade Germânica para Tecnologia de Gorduras que descreve cera como o termo coletivo para uma série de produtos, naturais ou sintéticos, que possuem as seguintes propriedades: aspecto maleável a 20°C, quebradiço a sólido, amorfo a finamente cristalino, translúcido a opaco, apresentando baixa viscosidade a temperaturas ligeiramente acima do seu ponto de fusão, com consistência e solubilidade dependente diretamente da temperatura e capazes de serem polidas por ligeira pressão (MUNOZ, 2005).

Quimicamente, porém, as ceras constituem uma ampla gama de diferentes classes químicas, incluindo predominantemente as ceras propriamente ditas (ésteres de álcoois graxos com ácidos graxos) e outros constituintes lipídicos tais como os esteróis livres e esterificados, triacilgliceróis, álcoois e ácidos graxos livres, cetonas, aldeídos e

hidrocarbonetos. Numa definição estrita, uma cera é o éster de um ácido graxo de cadeia longa com um álcool graxo de cadeia longa (LI & PARISH, 1998).

Segundo CHRISTIE (2003), a composição química, bem como o comprimento, o grau de insaturação e de ramificação dos constituintes alifáticos, variam com a fonte ou procedência das ceras.

2.1.2. Classificação das ceras

As ceras podem ser classificadas segundo vários critérios: de acordo com sua origem, suas propriedades físicas e químicas e suas aplicações. No entanto, a primeira diferenciação que se faz é segundo sua origem, sendo classificadas como naturais ou sintéticas (LI & PARISH, 1998).

As ceras naturais são classificadas em animais, vegetais e minerais. Dentre as naturais, as ceras de animais e de plantas são formadas através de processos bioquímicos e são produtos resultantes do metabolismo. Estas ceras, em geral, possuem composição extremamente complexa e exibem seu caráter céreo sem nenhum tratamento químico, diferenciando-se das sintéticas, que adquirem esta característica por meio de síntese. Existem animais, fundamentalmente insetos, que segregam cera através de glândulas, e plantas que produzem pequenas quantidades de cera em seus tecidos, em seu pólen, em suas sementes e como secreção de suas folhas, caules e frutos. A cera de abelha e lanolina são importantes exemplos de ceras animais e entre as vegetais podem ser incluídas a de carnaúba, denominada a rainha das ceras, a ouricuri e a candelilla. As ceras minerais foram formadas nos períodos geológicos, sendo conhecidas como ceras “fósseis”. Todas as ceras de petróleo, lignito (cera de Montana) e ozocerite pertencem a esta categoria (LI & PARISH, 1998; MUNOZ, 2005).

As ceras sintéticas foram desenvolvidas no século XX e as matérias-primas de partida são compostos de baixo peso molecular. Os produtos podem ser ceras no

sentido mais estrito da definição ou substâncias com caráter céreo parcial. Além disso, ceras naturais ou materiais similares podem ser modificados por reação química, como a esterificação, a amidação ou a neutralização de ceras ácidas, para se obter ceras parcialmente sintéticas (MUNOZ, 2005).

2.1.3. Principais componentes encontrados nas ceras

Apesar da grande diversidade de compostos presentes nas ceras, os principais componentes incluem os ésteres de ácidos graxos com álcoois graxos, ésteres de esteróis, álcoois e ácidos graxos de cadeia longa e hidrocarbonetos (CHRISTIE, 2003).

Os ésteres de cera são os mais importantes constituintes das ceras naturais, sendo produtos da reação de um álcool e um ácido, com eliminação de uma molécula de água. Possuem cadeias longas e número par de átomos de carbono. O ponto de ebulição dos ésteres é muito maior que o do ácido correspondente e, de algum modo, é influenciado pelo ponto de ebulição do álcool com o qual o ácido está ligado (GUNSTONE et al., 1986).

Álcoois graxos livres ou esterificados encontram-se amplamente distribuídos nas ceras animais e vegetais e possuem de 20 a 40 átomos de carbono. Após a hidrólise alcalina das ceras, os álcoois graxos de cadeia longa e esteróis são encontrados juntamente com os hidrocarbonetos na fração insaponificável, devido à sua insolubilidade em álcool e água (WARTH, 1947).

Ácidos graxos de cadeia longa, na forma livre ou combinada, são importantes constituintes de ceras de origem animal ou vegetal. Nas ceras de plantas, estes ácidos são em geral saturados e possuem comprimento de cadeia similar ao dos álcoois presentes. Hidroxiácidos têm um papel definido no metabolismo das plantas, sendo freqüentemente encontrados como constituintes de ceras (GUNSTONE et al., 1986).

Os hidrocarbonetos de particular interesse são os saturados, possuindo de 14 a 44 átomos de carbono. Hidrocarbonetos aparecem como os principais constituintes de muitas ceras animais e vegetais e são os principais componentes das ceras de petróleo (CHRISTIE, 2003).

Os esteróis constituem um grupo de compostos com uma ampla faixa de atividade biológica. São álcoois policíclicos que freqüentemente acompanham os óleos e as gorduras e, em menor extensão, as ceras. Os esteróis podem ser classificados conforme sua origem em esteróis de animais (zoosterol) ou esteróis de plantas (fitosteróis) e, dentre os fitosteróis, os mais importantes são o stigmasterol, o β -sitosterol e o campesterol (WARTH, 1947).

2.1.4. Ceras de superfícies de plantas

Como resultado das condições climáticas, muitas plantas armazenam ceras na epiderme de suas folhas como uma proteção contra a perda de água por evaporação. Regiões específicas, temperatura, períodos secos e chuvas abundantes são os responsáveis por intensificar a formação destes depósitos que, em alguns casos, podem formar camadas de vários milímetros de espessura. Tais ceras, além do papel importante na preservação do balanço de água entre a planta e o ambiente, fornecem também proteção contra danos causados por microorganismos e insetos (WARTH, 1947).

As ceras superficiais de plantas 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 dos outros lipídios encontrados em tecidos internos e organelas celulares da mesma planta (DOMINGUES & HEREDIA, 1998, citados por VIEIRA, 2003).

A Tabela 1 mostra a diversidade de componentes que podem estar presentes nas camadas de ceras que recobrem as superfícies das plantas (CHRISTIE, 2003).

Tabela 1. Constituintes encontrados nas ceras de superfície de plantas

COMPONENTE	ESTRUTURA	
n-alcanos	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$	21 a 35C - N ^o ímpar
Alquil ésteres	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	34 a 62C - N ^o par
Ácidos graxos	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$	16 a 32C - N ^o par
Álcoois graxos (primários)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y\text{CH}_2\text{OH}$	22 a 32C - N ^o par
Aldeídos	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y\text{CHO}$	22 a 32C - N ^o par
Cetonas	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	23 a 33C - N ^o ímpar
Álcoois graxos (secundários)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CHOH}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	23 a 33C - N ^o ímpar
β -dicetonas	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COCH}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	27 a 33C - N ^o ímpar
Triterpenóides	Esteróis, <i>alpha</i> -amirina, <i>beta</i> -amirina, uvaol, eritrodiool	
Ácidos triterpenóicos	Ácido ursólico, ácido oleanólico, etc.	

FONTE: CHRISTIE (2003)

2.1.5. Aplicações e usos para as ceras naturais e sintéticas

As ceras estão entre os materiais mais antigos utilizados pelo homem e sua versatilidade foi descoberta em épocas muito remotas. Atualmente, as ceras naturais dividem o mercado com as sintéticas, sendo utilizadas em todas as áreas de aplicação industrial como componentes de produtos para polimento (de pisos, sapatos, automóveis, etc.); produtos para proteção de couro; na indústria de papel e embalagens; na produção de tintas, vernizes e lubrificantes; na produção de filmes contínuos resistentes; na indústria cosmética (batons, esmaltes), alimentícia (chicletes, chocolates,

frutas) e também na indústria farmacêutica como veículo e excipiente (ADAMENAS, 1982; MUNOZ, 2005).

Entre as características particulares de muitas ceras estão sua capacidade de absorção e sua habilidade para formar finas dispersões ou emulsões estáveis (MUNOZ, 2005).

No setor alimentício, emulsões de ceras são utilizadas no recobrimento de frutas e queijos, e em gomas de mascar, com função de proteção e brilho. Segundo HERNANDEZ & BAKER (1991), as emulsões do tipo cera e água são mais estáveis do que as emulsões de óleo e água, devido ao alto ponto de fusão das ceras. WELLER et al. (1998), citados por VIEIRA (2003), estudaram a utilização de cera de carnaúba na fabricação de filmes protéticos e o produto resultante apresentou melhores propriedades de barreira de vapor e de extensão do filme.

2.2. Cana-de-açúcar

Pertencendo ao gênero *Saccharum*, família das gramíneas com grande número de variedades, a cana-de-açúcar é formada pelo colmo (caule), raízes, folhas e flores. Cresce em touceiras de quatro até vinte colmos, formados de nós e entre-nós, cada um com diâmetro de dois até oito centímetros, e atingindo até seis metros de altura (MARTUCCI, 1983).

Dentre as espécies do gênero *Saccharum* encontramos a *S. officinarum*, a mais rica em açúcar e mais pobre em fibra. Porém, por ser muito susceptível a moléstias, não pode satisfazer as necessidades da indústria. Assim, foram desenvolvidos híbridos com outras espécies como a *S. spontaneum*, *S. barbieri* e *S. sinense*, que possuíam boa resistência e pouco rendimento industrial. Hoje, em todo o mundo, se cultivam estes híbridos resistentes a doenças e pragas, ricos em sacarose e adaptados às condições locais de solo e clima (LEME JUNIOR & BORGES, 1965).

Os dados de rendimento em açúcar e de composição variam com as condições do clima, a variedade e idade da cana, a natureza e as condições do solo, a classe de fertilizantes, o sistema de cultivo e com o emprego ou ausência de irrigação (BAYMA, 1974). A Tabela 2 ilustra os principais componentes presentes na cana-de-açúcar (MARTUCCI, 1983).

Tabela 2. Composição química da cana-de-açúcar

Compostos	Teor (%)
Água	65 - 75
Açúcares	12 - 18
Fibras	8 - 14
Cinzas	0,4 - 0,8
Matérias nitrogenadas	0,3 - 0,6
Lipídios totais	0,15 - 0,25
Substâncias pécticas, gomas e mucilagens	0,15 - 0,25
Ácidos combinados	0,10 - 0,15
Ácidos livres	0,06 - 0,10
Matérias corantes	não dosadas

FONTE: MARTUCCI (1983)

É difícil determinar quando o açúcar se tornou conhecido para a humanidade, mas, possivelmente, passou da Nova Guiné para a Índia muitos séculos antes de Cristo (MAFRA, 2004). Da Índia, a cana-de-açúcar foi levada para a China e Oriente Próximo. Os árabes a levaram para o norte da África e sul da Europa e os chineses para Java e Filipinas. Colombo trouxe a cana para a América. Posteriormente, foi para Cuba,

Antilhas e o continente, iniciando-se o seu cultivo nos Estados Unidos, na Louisiana, em 1750 (LEME JUNIOR & BORGES, 1965).

No Brasil, a cana foi introduzida na época do descobrimento e, desde então, as indústrias cuja matéria-prima é a cana-de-açúcar, multiplicaram-se e modernizaram-se levando o Brasil à hegemonia mundial na produção de açúcar e álcool (CARVALHO, 1998). Em 2005, a produção de cana-de-açúcar atingiu 420 milhões de toneladas e espera-se para 2006 uma safra de 430 milhões (IBGE, 2005).

Além dos produtos tradicionais, açúcar e álcool, a indústria sucro-alcooleira vem nos últimos anos se mobilizando para buscar produtos alternativos, derivados de seus produtos principais ou obtidos a partir de subprodutos da fabricação destes (SERRA et al., 1997). Entre os produtos alternativos e de alto valor agregado, a cera de cana-de-açúcar possui um grande potencial, considerando o índice de extração da cera (0,0725%) sobre a quantidade de cana processada (PATURAU, 1969).

2.2.1. Cera de cana-de-açúcar

A síntese e a utilização de diferentes lipídios necessários para as funções vitais são fenômenos bem conhecidos no reino vegetal e a cana-de-açúcar não é uma exceção. Ainda que os lipídios presentes representem apenas uma pequena porcentagem do seu peso, a cana pode ser tomada potencialmente como uma fonte de cera, considerando a quantidade total produzida mundialmente (BALCH, 1953).

Na cana, os lipídios representam 0,18% do peso da planta e dividem-se em duas partes. A fração cerosa, originalmente chamada *cerosie*, derivada do latim *cera*, corresponde a 2/3 do total de lipídios e forma uma camada delgada, que recobre praticamente todas as superfícies expostas da planta, concentrando-se principalmente perto dos nós e das bainhas foliares. A fração oleosa ocorre no interior dos colmos e

em outras partes da cana, sendo constituinte essencial do protoplasma celular (PATURAU, 1969).

A quantidade de cera depositada pode variar, no entanto, dependendo principalmente da variedade da cana, sendo também influenciada por outros fatores, tais como as condições climáticas e pluviométricas sob as quais se desenvolve o cultivo (BALCH, 1953).

Durante a moagem da cana, uma grande proporção do material lipídico (cerca de 40%) dispersa-se no caldo como impureza suspensa. O remanescente permanece no bagaço, que é o resíduo após a extração do caldo (PATURAU, 1969).

O caldo obtido na moagem da cana-de-açúcar, que é realizada em duas etapas, segue para o peneiramento, com o objetivo de retirar pequenas fibras (BAYMA, 1974).

Nas fases posteriores, ocorre o tratamento do caldo da cana-de-açúcar para a remoção de sólidos dissolvidos e em suspensão. Este tratamento é realizado por meio de reagentes químicos e dos efeitos da temperatura. Os mecanismos de remoção são a coagulação, precipitação, floculação, sedimentação e filtração (MAFRA, 2004).

O caldo que está sendo tratado, ao ser submetido à decantação, divide-se em um líquido bastante claro e em uma camada que nas usinas chamam de “cachaça”. A parte limpa segue para os tanques de espera dos equipamentos de evaporação e a “cachaça”, composta principalmente por uma mistura de caldo, bagacilho, gomas, ceras, pigmentos e outras impurezas, é submetida à filtração, formando as tortas de filtro (BAYMA, 1974).

A filtração geralmente é realizada em filtros rotativos (sistemas contínuos) ou prensa (processo em batelada). As tortas de filtro prensa contêm aproximadamente 65% de umidade e as tortas obtidas nos filtros rotativos cerca de 85% (PATURAU, 1969).

A quantidade e composição das tortas de filtro variam conforme a localidade de plantio, variedade da cana, eficiência da moagem e método de clarificação empregado (BAYMA, 1974; PATURAU, 1969). Na Tabela 3 é mostrada a composição típica de uma torta de filtro.

Tabela 3. Composição típica de torta de filtração de cana de açúcar (base seca)

	Teor (%)
Lipídios Totais	5 – 14
Fibras	15 – 30
Açúcares	5 – 15
Proteína	5 – 15
Cinzas Totais	9 – 20
SiO ₂	4 – 10
CaO	1 – 4
P ₂ O ₅	1 – 3
MgO	0,5 – 1,5

FONTE: PATURAU (1969)

No tratamento ou clarificação do caldo, os lipídios são concentrados na torta, que pode ser utilizada na obtenção de cera, um produto com alto valor agregado (PATURAU, 1969).

Em geral, a torta de filtro é simplesmente espalhada sobre os campos de cultivo de cana-de-açúcar, como fertilizante, e, se esse material ficasse livre das gorduras e ceras que contém, a absorção de elementos nutrientes pelas plantas seria facilitada, pois a decomposição do material orgânico ocorreria mais rápido (ADAMENAS, 1982).

2.2.1.1. Obtenção da cera de cana-de-açúcar

2.2.1.1.1. Antecedentes

Avequin, um farmacêutico de Nova Orleans, foi o primeiro a isolar e purificar a cera de cana-de-açúcar, em 1841. No ano de 1909, WIJNBERG (1909) citado por PATURAU (1969), patenteou na França um método básico de recuperação e fracionamento de cera de cana, por extração com solventes, a partir de tortas de filtro. Conforme o autor, o solvente arrasta, além da cera, grande quantidade de matéria gordurosa. São estes materiais que conferem à cera bruta um caráter viscoso, consistência pegajosa e baixo ponto de fusão.

Na África do Sul, em 1916, foi construída a primeira planta em escala comercial para extração de cera de torta de filtro. Dela, somente em 1924, se exportaram para os Estados Unidos e Inglaterra 6.000 toneladas do produto. Alguns anos mais tarde foi desativada por problemas de qualidade. Em 1928, duas plantas em Cuba e outra na Austrália estavam produzindo cera de cana. Nesta mesma época, cera foi recuperada em escala comercial em Java. Em 1960, a planta da Austrália encerrou suas atividades, devido ao aumento dos custos (MEADE, 1967).

A partir de 1940, Cuba destacou-se na produção de cera de cana, com a construção de duas plantas extratoras de cera bruta. Em 1960, outra planta foi instalada, e o refinamento, que até então era realizado por uma refinaria nos Estados Unidos (Grammercy, Louisiana), começou a ser realizado internamente.

2.2.1.1.2. Extração da cera de cana-de-açúcar

Vários métodos para a recuperação da cera da cana-de-açúcar têm sido propostos: extração direta, por imersão dos colmos em tanques com água quente; extração a partir do caldo antes da clarificação e a partir do bagaço, porém, a extração

de cera das tortas de filtro, tem sido considerada a mais viável economicamente (WARTH, 1947).

A quantidade de cera e demais lipídios extraídos da cana varia segundo o tipo e a idade da planta, a composição do terreno, o hábito de queimar anualmente os canaviais, o clima e também a tecnologia de extração utilizada. Nas tortas, onde se encontram concentrados, a quantidade pode variar de 5 a 14% sobre a base seca e, em geral, a quantidade recuperada depende do solvente utilizado. Uma usina de porte médio, que trata diariamente 4000 toneladas de cana, renderia aproximadamente 3 toneladas de cera bruta (PATURAU, 1969).

Diferentes solventes como benzeno, hexano, álcool metílico e etílico, mistura de éter etílico e etanol, acetona e solventes de petróleo, têm sido usados para a extração da cera das tortas de filtro. Na seleção do melhor solvente, algumas propriedades são consideradas importantes, como o ponto de ebulição, que deve ser maior que o ponto de fusão da cera, o calor latente de vaporização e a taxa de evaporação, entre outros. Além disso, o custo tem papel importante, devido às perdas inerentes a qualquer processo de extração por solventes (ADAMENAS, 1982).

Entre os processos de extração de cera de cana-de-açúcar citados na literatura, a maioria faz referência à extração sólido-líquido, similar à extração de óleo de sementes oleaginosas. Nestes processos, são utilizadas tortas de filtro com umidade máxima de 12% e um ou dois solventes (PATURAU, 1969). Há também relatos de extração líquido-líquido, na qual a torta de filtro, com cerca de 85% de água, entra em contato com o solvente, em contra-corrente. A solução de cera é concentrada e a torta é tratada com vapor para recuperação do solvente (GARCIA et al., 1988).

Porém, em relação ao rendimento, verificou-se que os melhores resultados são obtidos com tortas secas, com umidade residual próxima de 2%, quando o solvente circula melhor, agindo com maior rapidez e eficiência. A torta seca pode conservar-se por até um ano, sem perda de cera; armazenada durante alguns meses, sofre uma lenta

transformação, na qual a coloração verde diminui, provavelmente pela transformação da clorofila em feofitina, gerando um produto de cor marrom (ADAMENAS, 1982).

BUTTAR et al. (1999) citados por VIEIRA (2003) testaram hexano, tolueno, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol para extração de cera de torta de filtração de cana e obtiveram rendimentos de cera de 8,3% (usando hexano) e 20,1% (usando metanol).

NUISSER et al (2002), utilizando o resíduo de fermentação e destilação de cana-de-açúcar de fábricas produtoras de rum, extraíram cera com ciclo-hexano em um equipamento tipo Soxhlet. O rendimento em cera bruta foi de 7%, e a composição por cromatografia gasosa e espectrometria de massa demonstrou alcanos e ésteres de cera como os principais componentes. Em adição, fitosteróis, triterpenos de éteres metílicos, ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos e ácidos graxos livres também foram encontrados. Segundo os autores, a composição da cera obtida apresentou boa concordância com os dados de ceras extraídas de tortas de filtro, e as diferenças encontradas podem ser explicadas pelas etapas de fermentação e destilação, inerentes ao processo de obtenção do rum, pela variedade e origem da cana e também pela tecnologia utilizada na obtenção da cera.

Em outro trabalho, VIEIRA (2003) estudou a extração de cera de tortas provenientes de cana queimada e não queimada (orgânica) com quatro solventes: n-hexano, ciclohexano, isopropanol e etanol e encontrou um rendimento maior em cera bruta para os solventes polares. Porém, após solubilização dos extratos obtidos em hexano e separação da fração de cera precipitada, os rendimentos utilizando-se solventes apolares foram superiores, 57% em média, em comparação com os rendimentos obtidos para os solventes polares, de 16%, aproximadamente.

A cor da cera bruta, obtida por extração com solvente, pode variar de marrom escuro até esverdeado escuro, quase preto, dependendo da variedade da cana utilizada, do método de clarificação e obtenção das tortas de filtro e do solvente usado

na extração da cera (HATT et al., 1953). Conforme BALCH (1953), a pigmentação escura é devida a uma pequena fração insolúvel em etanol a quente, que pode ser eliminada no processo de refinação.

2.2.1.1.3. Purificação de cera de cana-de-açúcar

A purificação ou o refino da cera de cana-de-açúcar, cujo principal objetivo é a eliminação da resina e a separação da fração dura, pode ser efetuada por alguns métodos citados na literatura, como destilação a vácuo e cristalização fracionada com solventes (WARTH, 1947; PATURAU, 1969).

Em geral, nos processos de purificação da cera bruta com álcool (etanol ou isopropanol), três frações são separadas: a cera, o óleo e a resina. O óleo constitui a fração solúvel em acetona/etanol/isopropanol, sendo um líquido de cor verde escura e de composição similar à de outros óleos vegetais. A cera é a fração solúvel em acetona a 100°C, sob pressão, e em isopropanol a 80°C. A resina é um sólido de cor preta brilhante e insolúvel nos solventes mencionados anteriormente, nas temperaturas de 70°C a 100°C (GARCIA et al., 1999; PHUKAN, 2002).

Na década de 60, várias instituições cubanas desenvolveram métodos para o refino da cera bruta utilizando isopropanol, etanol, acetona ou heptano. Os processos geralmente empregados consistiam na fusão da cera e sua posterior dispersão no solvente, que dissolve a fração oleosa e deixa a cera dura e a matéria resinosa como sólidos insolúveis. A suspensão formada é filtrada e a parte sólida é misturada com mais solvente e aquecida, a resina é separada da cera dura em solução e é eliminada pelo processo de decantação. Baseando-se no mesmo conceito, no início dos anos 80, foram implantados sistemas contínuos para o refino da cera bruta com etanol absoluto. Tais sistemas consistiam em centrífuga decantadora, para extração da fração oleosa, coluna de pratos vibratórios pressurizada, para a separação da cera dura e da resina e destilador molecular, para obtenção de frações mais nobres e com usos mais

específicos. A Tabela 4 mostra os rendimentos em cera refinada, óleo e resina, obtidos em uma planta de refino de cera de cana-de-açúcar utilizando etanol (GARCIA et al., 1988).

Tabela 4: Rendimentos em cera refinada, óleo e resina obtidos em uma planta de refino utilizando etanol

Cera refinada	35 a 40 %
Óleo	25 a 30 %
Resina	28 a 32 %

FONTE: GARCIA et al. (1988)

De acordo com MCLLOUD (1950), citado por BALCH (1953), a cera refinada (fração dura) obtida após separação da fração oleosa e da resina, consiste de uma mistura de ésteres (66%), ácidos livres (27%), álcoois livres (5%) e hidrocarbonetos (2%). A matéria insaponificável (cerca de 58%) é formada principalmente por álcoois primários de alto peso molecular. O ponto de fusão é aproximadamente 79°C, o valor de saponificação varia de 65 – 77 mg KOH/g e o índice de acidez de 23 – 28 mg KOH/g.

Segundo GARCIA et al. (1999), a fração oleosa é uma excelente fonte para obtenção de esteróis. Os fitosteróis são álcoois de origem vegetal e estão presentes no óleo na forma livre ou esterificada. A mistura de fitosteróis é composta principalmente por stigmasterol (32%), β -sitosterol (42%) e campesterol (45%) e, dependendo das condições de refino, a quantidade presente no óleo pode variar de 4 a 8%.

VIEIRA (2003) estudou um processo de purificação utilizando cristalização fracionada com hexano, para a separação das frações mais duras presentes nas ceras de cana-de-açúcar orgânica e queimada. As ceras obtidas apresentaram coloração

amarela e índices analíticos comparáveis às ceras de carnaúba e de abelha (Tabela 5), como pode ser observado a seguir:

Tabela 5. Características das ceras purificadas de cana-de-açúcar orgânica e queimada e das ceras comerciais de carnaúba e de abelha.

Parâmetro	cana orgânica	cana queimada	carnaúba	abelha
Índice de Acidez (mg KOH g ⁻¹)	20,54	17,23	13,09	22,28
Índice de Saponificação (mg KOH g ⁻¹)	77,85	76,50	72,32	75,60
Índice de Iodo – Wijs (mg I 100 g ⁻¹)	12,56	10,20	10,35	6,53
Matéria Insaponificável (%)	55,60	57,40	54,80	53,23
Tocoferol (α-tocoferol) (mg kg ⁻¹)	-	-	16,54	-
Clorofila (mg kg ⁻¹)	-	-	-	-
Fósforo (830 nm) (mg kg ⁻¹)	10,71	9,87	6,54	-

FONTE: VIEIRA (2003)

São inúmeras as aplicações industriais para a cera refinada e para as demais frações obtidas após o fracionamento da cera bruta de cana de açúcar e, como os desenvolvimentos de novos produtos e tecnologias são constantes, a demanda por ceras com propriedades específicas e bem definidas é crescente. Com este objetivo, investigadores cubanos têm citado a modificação química da cera por oxidação com O₃ e agentes químicos, a esterificação com poliálcoois e o emprego de sais metálicos, como procedimentos para a obtenção de um maior conteúdo de ésteres, maior dureza e ponto de fusão e menor índice de acidez (MENENDEZ & HATT, citados por GARCIA et al, 1988).

GARCIA et al. (2003) propuseram um novo processo de obtenção de cera de cana a partir da cutícula, chamada pelos autores de fração DERMAX. O objetivo do estudo era simplificar os processos de extração e refino e obter maiores volumes de cera purificada. No trabalho realizado, a camada cuticular foi raspada dos talos de cana mecanicamente e a cera foi recuperada utilizando-se duas unidades experimentais de extração sólido-líquido e três solventes com diferentes composições químicas: éter de petróleo, tricloroetileno e tolueno. Os valores médios de eficiência de extração foram de 4,71%, 4,18% e 3,73% para o éter, tricloroetileno e tolueno, respectivamente. A cera com maior ponto de fusão e dureza foi a obtida com tolueno e, de acordo com a caracterização físico-química realizada, a chamada “cera DERMAX” apresentou coloração marrom, alto ponto de fusão e conteúdo de cera dura de 90%. Segundo os autores, o processo de obtenção da cera a partir de tortas de filtro é ineficiente, devido às perdas inerentes ao processo, uma vez que grande quantidade de material permanece no bagaço, no suco e nas tortas. Ainda, segundo os autores, durante o processo de refino, parte da cera dura é arrastada para as frações óleo e resina e o rendimento em cera purificada é quatro vezes menor do que aquele indicado nas referências: 725 g de cera por tonelada de cana inicialmente utilizada na moagem (PATURAU, 1969).

2.2.1.1.4. Clarificação da cera de cana-de-açúcar

A cera refinada de cana-de-açúcar deve ser clarificada para melhorar suas características com relação à cor e ao odor. Tratamentos com adsorventes e métodos químicos têm sido testados, porém, a clorofila, presente em grande quantidade na cera e, possuindo comportamento similar aos lipídios, não é facilmente separada (WARTH 1947; PATURAU, 1969).

Em um processo conduzido em escala laboratorial, PHUKAN & BORUAH (1999) utilizaram carvão ativo como agente descolorante. A cera extraída com tolueno e posteriormente dissolvida em isopropanol e tratada com carvão ativo apresentou

coloração amarelo claro e baixo índice de acidez. Mais tarde, esta metodologia foi patenteada.

AZZAM (1986) realizou um trabalho em que a cera bruta, tratada com ácido clorídrico e purificada com álcool etílico a frio, foi destilada a vácuo. Após separação dos componentes de menor peso molecular, a cera foi submetida a tratamento com vários agentes clarificantes: ácido crômico, ácido nítrico, cloreto de sódio e clorato de potássio. O autor reporta que a cera da cana-de-açúcar obtida por refinamento a vácuo e branqueamento com ácido crômico apresenta características comparáveis em muitas propriedades químicas às ceras obtidas por outros métodos de refino, sendo, porém, superior na coloração.

BERTHOLD (1993), citado por KRELL (1996), descreve dois métodos químicos para clarificação da cera de cana-de-açúcar. No primeiro método, o autor emprega ácido oxálico e, no segundo, peróxido de hidrogênio, ambos dissolvidos em água. Após fusão da cera e adição do agente branqueador, a mistura é mantida aquecida e com agitação até que a clarificação desejada seja atingida. No final, a remoção do reagente deve ser feita com água.

Atualmente, muitas operações comerciais utilizam métodos químicos ou filtros adsorventes especiais para a clarificação das ceras. Na clarificação com adsorventes, a cera derretida é mantida sob agitação durante várias horas na presença de carvão ativo, terras Fuller ou diatomáceas e as impurezas adsorvidas são removidas com filtros prensa (KRELL, 1996).

2.3. Policosanol

2.3.1. Histórico

A cera de cana-de-açúcar, além de sua aplicação industrial como substituto para as ceras de carnaúba, abelha e sintéticas, tem sido objeto de interesse por sua composição química (TAYLOR, 2000). A cera de cana é uma fonte de álcoois alifáticos primários de cadeia longa, que encontram aplicações como agentes anti-plaquetários, anti-isquêmicos, anti-trombóticos e redutores de colesterol (LAGUNA GRANJA et al., 1997,1999; MAS et al., 1999).

Policosanol é o nome dado a esta mistura de álcoois, isolados e purificados da cera de cana-de-açúcar, com comprimento de cadeia variando de 24 a 34 átomos de carbono, sendo o octacosanol o principal componente (BRAVO et al., 1996).

A origem do policosanol é mais um tratado sócio-político do que um experimento científico. Em 1964, Che Guevara, ministro da indústria de Cuba, criou o primeiro centro de pesquisa pós-revolução patrocinado pelo estado, o Instituto Cubano para Pesquisas dos Derivados da Cana-de-Açúcar. A intenção era identificar agentes bioativos de alto valor, derivados da cana-de-açúcar e o primeiro produto com tal potencial foi o policosanol (CARR, 1999).

O início das pesquisas dos efeitos redutores de colesterol atribuídos ao policosanol data de 1972. Nesta época, o pesquisador japonês SHO demonstrou que ratos alimentados com açúcar bruto mostraram níveis significativamente menores de colesterol e triglicerídios, quando comparados àqueles alimentados com açúcar refinado, cujos níveis eram elevados. Posteriormente, este pesquisador identificou os componentes predominantes na casca da cana - a cera e os álcoois - e mostrou que estas substâncias reduziam o colesterol no plasma e fígado das cobaias estudadas. A partir de então, inúmeros estudos têm mostrado os efeitos do policosanol na redução do colesterol em modelos experimentais (ARRUZAZABALA et al., 1994), voluntários

saudáveis (ARRUZAZABALA et al., 2002) e pacientes com hiperlipoproteinemia (PONS et al., 1993; ANEIROS et al., 1995; CASTANO et al., 2003).

2.3.2. Fontes de álcoois alifáticos primários

Álcoois alifáticos primários possuindo 20 a 40 átomos de carbono estão amplamente distribuídos em germes, grãos e outros componentes de nozes, sementes, frutos e cereais (KAWANISHI et al., 1991). No grão de trigo, esta mistura de álcoois ocorre em pequenas quantidades, menos de 0,1%, na forma de ésteres de alquil de ácidos graxos de cadeia longa. Os maiores componentes presentes no grão de trigo incluem palmitoil hexacosanol e aracdoil, palmitoil e behenoil tetracosanol (OHNISHI et al., 1986).

2.3.3. Métodos para obtenção de mistura de álcoois de diversas fontes

Os álcoois presentes nas ceras, na forma livre ou esterificada, constituem a maior parte da fração insaponificável, juntamente com os esteróis e hidrocarbonetos. Assim, para a separação e a obtenção da mistura de álcoois, a cera deve ser exaustivamente saponificada por adequado tratamento com álcali, na presença de um solvente adequado (WARTH, 1947).

Em um estudo realizado com cera de lanolina, HORNER & TRUTER (1950), observaram que a hidrólise da cera com soluções de álcali diluídas era realizada com dificuldade. Segundo os autores, mesmo após o período de 100 horas, a reação do tipo cera em água não era completa, se utilizadas soluções aquosas de NaOH 0,5 N. Porém, na presença de soluções mais concentradas (6 N), a hidrólise total era concluída em um período de 6 horas, à temperatura de 100°C. Segundo os autores, a diferença entre os dois resultados podia ser explicada, não somente pela maior concentração do álcali, mas também por mudanças na natureza da interface dos ésteres, e pela presença dos

produtos da reação. Em reações deste tipo, duas condições devem ser totalmente preenchidas para que a saponificação seja completa: os reagentes devem penetrar na interface e devem estar bem orientados para que a reação ocorra.

SEXTON & WARD (1935) reportaram que a saponificação de ceras, utilizando-se soluções aquosas de álcali, produzia muita espuma e propuseram um processo para a obtenção de uma mistura de álcoois no qual a cera foi saponificada com hidróxido de sódio sólido. Após a saponificação, o material resultante foi destilado a baixa pressão, onde a temperatura máxima não ultrapassou 250°C. Segundo os autores, quando temperaturas elevadas, acima de 300°C, são empregadas, pode ocorrer decomposição dos álcoois formados.

Em outro trabalho com cera de lanolina, TRUTER (1950) reportou que a hidrólise da cera pode ser tratada como uma matéria relativamente simples e relacionou três tipos de reação teoricamente possíveis: (a) saponificação homogênea com álcali alcoólico; (b) saponificação heterogênea com hidróxido sólido, sem diluição, e (c) saponificação heterogênea com um líquido imiscível, como álcali aquoso. Conforme o autor, as reações do tipo (a) são as mais adequadas e, neste caso, a velocidade da reação será tanto maior quanto mais alto for o ponto de ebulição do solvente utilizado. O autor cita também que, se o objetivo da saponificação for a obtenção dos álcoois graxos após a hidrólise, as reações do tipo (b) não devem ser utilizadas, pois o excesso de álcali pode reagir com os álcoois primários, formando sais de ácidos carboxílicos, como mostrado pela reação: $RCH_2OH + NaOH \rightarrow RCOONa + 2 H_2$.

BARNES et al. (1952), citados por TRUTER (1950), confirmaram que a saponificação alcoólica de cera de lanolina não apresenta dificuldades e que, se utilizados solventes com maior ponto de fusão, a reação se processa mais rapidamente. Conforme os resultados obtidos pelos autores, a reação realizada com hidróxido de sódio 1,25 N em metanol foi concluída em uma hora, enquanto que a reação utilizando-se a mesma concentração de álcali, porém em etanol, requer somente 30 minutos para que a hidrólise seja completa.

Em um procedimento para determinação dos álcoois e ácidos graxos presentes na cera de lanolina, ABRAHAM & HILDITCH (1935) hidrolisaram 250 g de cera com 200 g de KOH, na presença de 1,5 litros de álcool 95%. A reação foi realizada sob refluxo, por um período de 36 horas. Após a saponificação, o álcool foi removido e o material resultante foi aquecido até a ebulição com ácido sulfúrico diluído. Os álcoois e ácidos solidificados foram separados, lavados com água levemente alcalina e aquecidos até ebulição, com um excesso de solução de cloreto de cálcio. Após resfriamento da solução, o sobrenadante formado foi separado, seco e extraído com acetona em um equipamento tipo Soxhlet. Após extração, o solvente foi evaporado e o produto resultante dissolvido em éter e lavado com solução aquosa de carbonato de potássio e, posteriormente, com água para obtenção da mistura de álcoois. Os sais de cálcio formados, presentes nos resíduos após a extração com acetona e nas soluções de lavagem, foram aquecidos até a ebulição com ácido clorídrico concentrado e os ácidos liberados foram extraídos com éter, lavados com água e secos para a realização das análises.

Um processo para produção de álcoois e ácidos graxos a partir de cera de lanolina foi patenteado por SUNDE & RICHEV (1970). Na patente proposta, a cera foi saponificada com álcali, na presença de isopropanol e água, e os álcoois foram separados com hexano em uma coluna extratora, em um sistema contínuo em contracorrente. O extrato obtido, coletado no topo da coluna, foi lavado com solução aquosa de KOH 1% e, finalmente, com água para remoção dos sais de ácidos graxos (sabões). O solvente foi evaporado e o produto resultante foi submetido à destilação para obtenção da mistura de álcoois. A recuperação dos ácidos graxos foi realizada acidificado-se a solução de sais de ácidos graxos (sabões), remanescente do processo, com ácido sulfúrico, até pH próximo de 7,0. Os ácidos formados foram separados, lavados com água e submetidos à secagem.

BERTHOLET et al. (1991) citados por KRELL (1996) descreveram um método para obtenção de uma mistura de álcoois a partir de cera de plantas, como cera do óleo de farelo de arroz, cera de carnaúba e óleo de jojoba. No método descrito pelos autores,

a cera foi primeiramente dissolvida em um solvente orgânico imiscível em água, como butanol ou pentanol e, posteriormente, hidrolisada com solução aquosa de hidróxido. Os sais de ácidos graxos (sabões), resultantes da reação, foram solubilizados na camada aquosa alcalina e os álcoois permaneceram na camada orgânica, que continha 90% de álcoois, no mínimo. Segundo os autores, o rendimento obtido foi de aproximadamente 50% e a composição do produto final era dependente da origem da cera.

TRUTER (1950) reportou que a extração dos álcoois graxos com água, após saponificação da cera de lanolina, resultava em soluções aquosas contendo sabões e com formação de muita espuma. Assim, o método mais utilizado era secar o material saponificado e proceder à extração dos álcoois com um solvente no qual os sabões são insolúveis. Uma técnica utilizada por BARNES et al. (1952), citados pelo mesmo autor, foi diluir a cera saponificada em etanol e água, e então extrair os álcoois com éter de petróleo, em sucessivos tratamentos (oito extrações). Os extratos combinados eram evaporados, para obtenção dos álcoois, e os ácidos podiam ser recuperados por acidificação da fase alcoólica com ácido mineral e extração com éter de petróleo.

2.3.4. Obtenção de policosanol de cera de cana-de-açúcar

A mistura de álcoois alifáticos primários lineares, denominada policosanol, obtida de derivados da cana-de-açúcar, têm sido estudada por diversos autores, com o objetivo de conhecer sua composição e características. Com esta finalidade, LAMBERTON et al. (1959) propuseram diferentes métodos de separação destes álcoois e realizaram sua caracterização por cromatografia gasosa.

HORN & MARTIC (1957), citados por KRANZ et al. (1960), propõem um método para a obtenção de álcoois graxos da cera cuticular da cana-de-açúcar, que se baseia na saponificação homogênea com hidróxido de potássio alcoólico, seguida de uma esterificação do material saponificável e posterior destilação molecular. Outra forma de

separação da mistura de álcoois, proposta pelos autores, é a utilização de uma coluna com alta eficiência e alto vácuo.

Em outro trabalho, LAMBERTON et al. (1959), citados por LAGUNA GRANJA et al. (1999), propuseram um processo de saponificação utilizando hidróxido alcalino para a separação de álcoois a partir da cera de cana-de-açúcar. Neste estudo, os autores desenvolveram um processo de separação do material insaponificável por cromatografia em coluna com alumina e obtiveram três frações: hidrocarbonetos, compostos carbonílicos e carboxílicos conjugados e álcoois.

Todos estes procedimentos descritos têm valor do ponto de vista analítico, porém sua implementação em grande escala é difícil, porque o emprego de cromatografia em coluna e destilação molecular são métodos considerados muito caros (LAGUNA GRANJA et al., 1999).

GUPTA e colaboradores (1985), citados por (LAGUNA GRANJA et al., 1997), solucionaram em parte estas dificuldades propondo um procedimento para a extração dos álcoois, a partir da cera refinada, que se baseia em uma saponificação em fase homogênea. A cera foi fundida a 100 – 120°C, com adição posterior de 10% em peso de hidróxido de potássio, dissolvido em quantidade igual de água. A saponificação foi realizada com agitação ocasional durante 1,5 horas. Ao término da saponificação, a água residual foi evaporada, sendo a umidade remanescente retirada por destilação azeotrópica com benzeno. O produto obtido foi convertido em pó e extraído com benzeno ou 1,2-dicloroetano, obtendo-se os ácidos em forma de sais e um rendimento em álcoois de aproximadamente 7%.

LAGUNA GRANJA et al. (1997; 1999) patentearam um processo para a obtenção do policosanol, baseado em uma saponificação homogênea da cera de cana-de-açúcar, com solução concentrada de hidróxido de sódio, potássio ou cálcio. Nos exemplos citados nas patentes, a concentração de hidróxido variou de 5 a 30% e o tempo, de 3 a 10 horas. No sólido obtido, foi realizada uma extração sólido-líquido, onde a mistura de

álcoois foi extraída de forma seletiva, empregando-se um solvente orgânico adequado, escolhido entre álcoois de 1 a 6 átomos de carbono, hidrocarbonetos de 6 a 9 átomos de carbono, cetonas de 3 a 8 átomos de carbono e compostos aromáticos, como benzeno e seus derivados, ou misturas destes. O período de extração variou de 5 a 20 horas. Posteriormente, o produto foi sucessivamente cristalizado, utilizando um dos solventes acima mencionados ou suas misturas. O rendimento obtido foi 13 a 27,4% e, a pureza, de 92,72 a 94,34%. O perfil do material obtido inclui o octacosanol como o maior componente (60-70%), seguido pelo triacontanol (10-15%), hexacosanol (5,5-8,5%), dotriacontanol (4-6%), heptacosanol (2-3,5%), tetratriacontanol (0,4-2%), nonacosanol (0,4-1,5%) e tetracosanol (0,5-1%).

Como uma referência importante para a análise dos álcoois, VIEIRA (2003) determinou o teor de octacosanol e a composição em álcoois graxos de ceras de cana orgânica e queimada, bruta e purificada, obtendo os resultados mostrados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Teor de octacosanol em diferentes amostras de cera de cana-de-açúcar

Amostra	Concentração (%)
Cera bruta – cana orgânica	11,85
Cera bruta – cana queimada	12,85
Cera purificada – cana orgânica	19,08
Cera purificada – cana queimada	22,48

FONTE: VIEIRA (2003)

Tabela 7. Composição em álcoois graxos de diferentes amostras de ceras de cana-de-açúcar

Álcool Graxo	% relativa *			
	Cana orgânica bruta	Cana queimada bruta	Cana orgânica purificada	Cana queimada purificada
24:0	7,81	9,42	7,09	8,04
26:0	9,19	10,14	8,90	10,53
28:0	61,54	63,79	67,28	67,70
30:0	12,25	8,67	11,06	7,64
32:0	6,04	4,58	5,57	3,44
34:0	tr	tr	tr	tr
NI	2,15	2,38	-	1,64

* álcool graxo derivado de amostras de cera e analisado como álcool primário

NI = não identificado; tr < 0,5%

FONTE: VIEIRA (2003)

2.3.5. Determinação do conteúdo de álcoois graxos e análises físico-químicas e mecânicas do policosanol

Um método cromatográfico, usando uma coluna empacotada e 1-eicosanol como padrão interno, foi desenvolvido e validado para a determinação do conteúdo de álcoois graxos em cápsulas contendo 5 mg de policosanol. Os álcoois foram determinados como derivados de trimetilsilil, preparados com N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida. O método possibilitou a detecção dos produtos de degradação com tempos de retenção elevados, sem interferir com os picos do princípio ativo. Boa linearidade (coeficiente de correlação = 0,9996) e precisão (recuperação média = 100,27% +/- 1,66%) foram

obtidos em uma faixa de 50-150% da concentração nominal. A reprodutibilidade foi examinada em um estudo experimental, onde sete mudanças operacionais foram realizadas e os resultados observados foram quantificação, repetibilidade, resolução e o tempo de retenção relativo. Entre os resultados apresentados pelo autor, somente o tempo de retenção relativo foi significativamente afetado quando o tamanho da coluna mudou de 2,1 m para 3,1 m (CANAVACIOLO & HERNÁNDEZ, 1999). Em outro estudo, SIERRA et al. (2002), utilizando a mesma metodologia desenvolvida por CANAVACIOLO & HERNÁNDEZ (1999), validaram um método para determinação dos álcoois graxos em cápsulas contendo 10 mg de policosanol e encontraram valores semelhantes com relação à linearidade, precisão e reprodutibilidade. Conforme os autores, o método se mostrou adequado para o controle de qualidade do processo e para o estudo da estabilidade destas cápsulas.

As características físico-mecânicas do policosanol, isolado de cana-de-açúcar, têm sido reportadas por URIBARRI et al. (2002). Análises térmicas (DSC) foram utilizadas para avaliar a pureza do produto e também a distribuição do tamanho de partícula. Os lotes de policosanol estudados mostraram baixa solubilidade na maioria dos solventes utilizados na indústria farmacêutica e sua solubilidade em água ou em soluções aquosas foi nula.

2.3.6. Policosanol e saúde

Atualmente, uma parte da população sofre de hiperlipidemia ou elevados níveis de colesterol no plasma sanguíneo, que tem sido implicados como as principais causas das doenças do coração. A placa aterosclerótica, o ateroma, é a lesão característica e representa o final de um processo que começa com o depósito de lipídios nas células dos músculos lisos da parede vascular (BERKOV, 1978).

A compreensão das várias hiperlipidemias requer o conhecimento dos vários tipos de lipoproteínas que circulam na corrente sanguínea, já que é em associação com

estas proteínas que quase todos os lipídios (exceto os ácidos graxos livres) são transportados. Entre as mais importantes estão as "*Low-Density Lipoproteins*", ou LDL, que transportam o colesterol do sítio de síntese - o fígado - até as células dos outros tecidos, sendo conhecidas como "mau colesterol" e as "*High Density Lipoproteins*", ou HDL, que transportam o excesso de colesterol dos tecidos de volta para o fígado (onde é utilizado para a síntese dos sais biliares), conhecidas como "bom colesterol" (LEVY, 1996).

Experiências comprovam que os medicamentos mais comumente utilizados para redução dos níveis de lipídios no sangue são as drogas "statin" e, estudos publicados pelo United States National Health and Nutritional Examination Survey indicaram que 5,5 milhões de americanos, com doenças coronárias, poderiam ser tratados com medicamentos deste tipo. Porém, somente uma pequena parte deles recebem tratamento, uma vez que a maioria dos pacientes relutam em ser tratados com drogas químicas, especialmente nos casos de prevenção. Assim, os profissionais da saúde têm buscado alternativas que sejam igualmente eficazes, seguras e idealmente naturais para prevenir as doenças cardiovasculares e, neste contexto, o policosanol têm sido uma opção atrativa (GOUNI-BERTHOLD & BERTHOLD, 2002).

Quase a totalidade dos estudos sobre os diversos efeitos atribuídos ao policosanol tem sido realizados por pesquisadores cubanos (ARRUZABALA et al., 1994; TORRES et al., 1995; VALDEZ et al., 1996, CRESPO et al., 1997, MENENDEZ et al., 2000; CASTANO et al., 2002).

2.3.6.1. Efeitos farmacológicos atribuídos ao policosanol

Composições de policosanol isoladas de cera de cana-de-açúcar têm mostrado reduzir os níveis de colesterol em animais e humanos (MENENDEZ et al., 2000; CRESPO et al., 1999). Os efeitos farmacológicos atribuídos ao policosanol, baseados em modelos experimentais, mostram que a composição é dose dependente e diminui

significativamente o colesterol total do sangue e os níveis de LDL, com aumento dos níveis de HDL. Os níveis de triglicerídios também são significativamente reduzidos, porém, a redução não é dependente da dose administrada (ARRUZAZABALA et al., 1994; MENENDEZ et al., 1997).

A administração de policosanol não somente diminui significativamente os níveis de colesterol do sangue, como também o conteúdo de colesterol em diferentes tecidos como o fígado, coração e tecidos adiposos (CRUZ et al., 1991).

O policosanol reduz a agregação plaquetária por alteração da síntese de prostaglandina, mais especificamente, por diminuir no sangue os níveis da tromboxane A₂, pró-agregatória e aumentar os níveis da prostaglandina prostaciclina, anti-agregatória (VALDEZ et al., 1996).

Composições de policosanol previnem e revertem lesões ateroscleróticas e trombozes (NOA et al, 1994; 1994) e mostram-se efetivas como antioxidantes, limitando a oxidação do LDL-colesterol (HERNANDEZ et al., 1995).

2.3.6.2. Mecanismos de ação do policosanol

Em numerosos experimentos, pesquisadores têm tentado determinar como o policosanol modifica os lipídios do sangue e o metabolismo das lipoproteínas. Alguns comparam o policosanol às drogas “statin”, cujo mecanismo de ação é a inibição da HMG-CoA redutase, responsável pela conversão do HMG-CoA em mevalonato, um passo limitante na biossíntese do colesterol. Recentemente, pesquisadores têm sugerido que o policosanol altera a atividade desta enzima, por mecanismos que operam independentemente da inibição direta da mesma. Isto poderia incluir uma alteração na expressão do gene, alterações na própria síntese da proteína ou mesmo a quebra da enzima, ou uma combinação de todos estes efeitos. Porém, nenhum estudo realizado tem medido diretamente qualquer um destes parâmetros e, supõe-se, pelo

menos como descrito nos estudos “in vitro”, que o policosanol possui os mesmos efeitos que as drogas “statin”, agindo, no entanto, por um mecanismo ligeiramente diferente (MENENDEZ et al., 1996; 2001).

Pesquisas “in vivo” foram realizadas com a administração oral de octacosanol- C^{14} , em várias doses, e a absorção em roedores ficou na faixa de 10% a 35% e a biodisponibilidade entre 5% e 12%. Nestas pesquisas, foi demonstrado também que a fração absorvida distribui-se em muitos tecidos e pode ser parcialmente transformada em ácidos graxos (KABIR & KIMURA, 1993).

MENENDEZ et al. (1996), realizando estudos de absorção radioativa em animais (ratos, coelhos e macacos) e humanos, mostraram que o policosanol é rapidamente absorvido e que os níveis de pico na circulação sanguínea foram observados 30 a 120 minutos após a administração do medicamento. A radioatividade foi observada principalmente no fígado, já que os níveis de radioatividade na circulação sistêmica foram baixos. Este efeito é uma vantagem para um agente redutor de colesterol, uma vez que o fígado é o principal órgão que regula sua síntese e metabolismo.

Em outro estudo, MENENDEZ et al. (1997) mostraram que as mudanças induzidas pelo policosanol no metabolismo do colesterol hepático podem ser causadas pela presença, não somente dos álcoois alifáticos, mas também por ácidos graxos de cadeia longa e metabólitos secundários de cadeia curta.

Apesar dos efeitos do policosanol no metabolismo das lipoproteínas e na redução do colesterol serem atribuídos principalmente ao octacosanol, seu maior constituinte, em alguns experimentos, a mistura específica dos álcoois alifáticos tem mostrado ser ligeiramente superior (RIZZO et al., 1987).

2.3.6.3. Uso do policosanol em populações de pacientes especiais

2.3.6.3.1. Pacientes com distúrbios hepáticos e com hipercolesterolemia tipo II

A eficácia do tratamento realizado com policosanol em pacientes com hipercolesterolemia e distúrbios hepáticos tem mostrado ser similar àquela realizada em pacientes que não apresentam debilidade do fígado. O policosanol reduziu o colesterol total (13,6%), o LDL (19,1%), a razão LDL/HDL (25,5%) e aumentou o HDL (11,5%). Em adição, a administração de policosanol mostrou diminuir os níveis de alanina amino transferase (ALT) e gama-glutamiltanspeptidase (GGT) para valores normais (ZORDOYA et al., 1996).

2.3.6.3.2. Pacientes com hipertensão

Pacientes hipertensivos e com hipercolesterolemia, tratados com policosanol, mostraram redução significativa nos níveis de LDL (19,1%), de colesterol total (13%) e da razão colesterol/HLD (20,0%) e LDL/HDL (24,2%), e aumento significativo nos níveis de HDL (17,1%). Nestes pacientes, houve diminuição da pressão sistólica, enquanto que nos pacientes tratados com placebos a pressão permaneceu inalterada (CASTANO et al., 1996).

2.3.6.3.3. Pacientes com diabete

Uma vez que as doenças coronárias são as principais causas de morte em pacientes com diabetes mellitus e, sua lipidemia característica, marcada por concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue sendo o maior fator de risco, a eficácia de novos agentes redutores de lipídios deve ser investigada neste grupo de pacientes (GOUNI-BERTHOLD & BERTHOLD, 2002).

A administração de policosanol em pacientes com diabetes mellitus não dependentes de insulina (NIDDM) e com hipercolesterolemia tipo II, reduziu

significativamente os níveis de LDL, bem como os níveis de colesterol total do sangue e a razão aterogênica LDL/HDL. Os valores de triglicerídios, níveis de glicose e hemoglobina (Hb) A₁ permaneceram inalterados (TORRES et al., 1995; CRESPO et al., 1997).

2.3.6.3.4. Pacientes idosos

O policosanol administrado em pacientes idosos com hipercolesterolemia, por períodos de 6 e 12 meses, mostrou ser efetivo, seguro e bem tolerado. Nesta população, o perfil de eficácia atribuído ao policosanol foi similar ao observado em pacientes mais jovens. De particular importância é o fato que, nestes pacientes, nenhuma experiência adversa relacionada ao tratamento utilizando policosanol foi observada. Pacientes idosos são de risco, principalmente com relação a problemas renais e hepáticos, e também pela coexistência de doenças e utilização concomitante de vários medicamentos (PONS et al., 1993; CASTANO et al., 1995).

Pacientes idosos, com hipertensão e hipercolesterolemia tipo II, tratados com doses de 20 mg/dia de policosanol isolado de cera de cana-de-açúcar, durante 12 meses, mostraram significativo decréscimo nos níveis de LDL e LDL/HDL, e aumento nos níveis de HDL (CASTANO et al., 2001 e 2002).

2.3.6.4. Estudos comparativos entre o policosanol e outras drogas redutoras de lipídios

Têm sido proposto que composições de policosanol, isoladas de cera de cana-de-açúcar, poderiam potencialmente fornecer um novo tratamento para doenças cardiovasculares, com igual ou melhor efeito clínico que as drogas normalmente utilizadas com esta finalidade, como: simvastatin, pravastatin, lovastatin, benzafibrato, probucol (GOUNI-BERTHOLD & BERTHOLD, 2002).

Doses iguais de simvastatin e policosanol (10 mg/dia), ministradas em pacientes idosos com moderada hipercolesterolemia primária, mostraram que ambas drogas, nas quantidades indicadas, apresentaram eficácia similar com relação à redução do colesterol total e LDL-colesterol (ORTENSI, 1997). Em pacientes com hipercolesterolemia tipo II e concomitante diabetes mellitus não dependente de insulina, somente o policosanol aumentou significativamente os níveis de HDL e poucas experiências adversas foram relatadas (ILLNAIT, 1997). Em outro estudo, com duração reduzida (seis semanas), comparando a eficácia do policosanol (10 mg/dia) com a do pravastatin (10 mg/dia), a redução do colesterol total foi similar para os dois medicamentos avaliados, porém, o decréscimo no LDL-colesterol e o aumento no HDL-colesterol foram mais pronunciados durante o tratamento com policosanol. Neste grupo de pacientes, os efeitos adversos foram também menos freqüentes (BENITEZ et al., 1997). Em outra experiência, realizada em pacientes com diabetes mellitus não dependentes de insulina, comparando policosanol (10 mg/dia) com lovastatin (20 mg/dia), os resultados atribuídos ao policosanol mostraram-se superiores na redução do colesterol total e LDL-colesterol, e no aumento do HDL-colesterol (CRESPO et al., 1999).

Os efeitos do benzafibrato isolado (400 mg/dia) e benzafibrato mais policosanol (10 mg/dia) foram comparados e os resultados mostraram que a coadministração é segura e que o policosanol pode intensificar os efeitos da monoterapia atribuída ao fibrato, na elevação do HDL e redução do LDL, enquanto que a diminuição dos triglicéridios não foi afetada. Porém, como para as drogas statin, as experiências adversas reportadas pelos pacientes tratados com fibratos, têm sido mais freqüentes do que pelos pacientes tratados com policosanol (MARCELLO et al., 2000).

Em outro estudo comparativo realizado com policosanol e probucol em pacientes com hipercolesterolemia tipo II, por 8 semanas, mostrou-se que policosanol é mais efetivo do que probucol na redução dos níveis de LDL e de colesterol total. Ambas as drogas foram seguras e bem toleradas (PONS et al. 1997).

2.3.6.5 Outros efeitos farmacodinâmicos atribuídos ao policosanol

As plaquetas têm um papel central na patogênese da aterosclerose e subseqüentes eventos isquêmicos. Em adição, a terapia antiplaquetária é efetiva na prevenção secundária dos eventos cardiovasculares, sendo o ácido acetil salicílico (AAS) a droga antiplaquetária mais amplamente estudada e considerada a terapia antiplaquetária padrão (MOLINA et al., 2003).

O policosanol reduz a agregação plaquetária por alteração na síntese de prostaglandina, diminuindo os níveis no sangue da enzima pro-agregatória tromboxane A₂ (TXA₂) e aumentando a concentração da enzima anti-agregatória prostaglandina prostaciclina. Ensaios clínicos realizados em pacientes têm mostrado que o policosanol inibe significativamente a agregação plaquetária, sem afetar os parâmetros de coagulação (VALDES et al., 1996; CARBAJAL et al., 1994).

Composições de policosanol têm exibido também efeito anti-trombótico (CARBAJAL et al., 1998) com significativa inibição da agregação plaquetária (ARRUZAZABALA et al., 1993). Adicionalmente, de forma diferente que o AAS, o policosanol não afeta a enzima anti-agregante plaquetária PGI₂, mas inibe a enzima agregante plaquetária tromboxane B₂ (TXB₂) (CARBAJAL et al., 1998). Isto torna a combinação terapêutica do policosanol com o AAS uma opção atrativa (ARRUZAZABALA et al., 1997).

O policosanol tem mostrado pronunciado efeito antiplaquetário com animais e há evidências que um decréscimo na tromboxane B₂ e um aumento no nível de prostaciclina estejam envolvidos (CARBAJAL et al., 1994). Estes efeitos foram também discutidos como o mecanismo responsável pela ação antiisquêmica do policosanol, demonstrada em modelos de isquemia cerebral (MOLINA et al., 1999). Efeitos antiplaquetários foram também demonstrados em voluntários saudáveis durante dose única ou prolonga (ARRUZAZABALA et al., 1996) e em pacientes com hipercolesterolemia (ARRUZAZABALA et al., 1998).

2.3.6.6. Dosagem recomendada e contra-indicações atribuídas ao policosanol

A dose inicial recomendada de policosanol é 5 mg uma vez por dia, ministrada à noite, a qual pode ser aumentada para 10 ou 20 mg por dia. Maiores dosagens, até 80 mg/dia, estão sendo estudadas. O policosanol é contra-indicado durante a gravidez, embora nenhum efeito teratogênico tenha sido encontrado em modelos animais (RODRIGUES, 1997; 1998). Não é conhecido se a droga ou seus metabólitos passam para o leite humano; portanto, a terapia deve ser descontinuada durante a lactação. Tratamento de crianças não é recomendado, devido à falta de experiência nesta população em particular. A administração de policosanol em pacientes mais velhos tem se mostrado segura e, em pacientes com debilitada função hepática, a dose administrada não necessita ser reduzida (GOUNI-BERTHOLD & BERTHOLD, 2002).

2.3.6.7. Toxicidade e perfil de segurança clínica atribuídos ao policosanol

A segurança e eficácia do policosanol foi documentada em pacientes hipercolesterolêmicos mais velhos em um estudo prolongado. Nesta população especial, onde debilidades nas funções renais e hepáticas e administração de múltiplos medicamentos são freqüentes, nenhum evento adverso relacionado à droga foi observado (CASTANO et al., 1995).

Um estudo em pacientes com hipercolesterolemia tipo II e dois ou mais fatores de risco adicionais, atribuídos às doenças cardiovasculares, confirmou um bom perfil de segurança e eficácia da droga (MAS et al., 1999).

Resultados de experimentos clínicos indicam que doses diárias de 5 a 40 mg de policosanol modificam o metabolismo dos lipídios do sangue, mostrando redução significativa dos níveis de LDL e aumento dos níveis de HDL (ANEIROS et al., 1995), tendo sido sua eficácia e tolerabilidade documentada em mais de 3000 pacientes e 60 ensaios clínicos (GOUNI-BERTHOLD & BERTHOLD, 2002). Estudos em animais têm

mostrado que mesmo doses extremamente elevadas não reportam efeitos tóxicos ou carcinogênicos (ALEMAN et al., 1998). Estudos clínicos em pacientes recebendo doses diárias de 20 a 40 mg de policosanol por 2 anos não demonstraram qualquer efeito colateral (CRESPO et al., 1999).

O policosanol mostrou-se seguro em uma dosagem de até 500 mg/kg/dia, a qual é 1500 vezes maior que a dosagem padrão recomendada (20 mg/dia) nas referências para seres humanos. Ratos tratados com uma dose de 500 mg/kg/dia por 12 meses não exibiram sinais de toxicidade ou carcinogênese, resultante do tratamento com policosanol (ALEMAN et al, 1994). Doses de 180 mg/kg/dia, ministradas em cachorros durante um ano não mostraram nenhum efeito adverso resultante da composição (MESA et at, 1994) e doses de 25 mg/kg/dia ministradas em macacos por 54 meses não mostraram efeitos colaterais (RODRIGUEZ et al., 1997). Em ensaios de reprodução e fertilidade, composições de policosanol não exibiram efeitos adversos em ratos alimentados com até 500 mg/kg/dia por 60 dias (RODRIGUEZ & GARCIA, 1998).

3. MATERIAL, MÉTODOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Material

3.1.1. Matéria prima

- Cera bruta de cana-de-açúcar orgânica (não queimada antes do corte), extraída de tortas de filtro com hexano, procedente da Usina São Francisco (Sertãozinho, SP), processada em dezembro de 2002.

- Cera purificada de cana-de-açúcar, obtida a partir da purificação da cera bruta, utilizando o processo do álcool etílico a quente (vide item 3.3.2).

3.1.2. Reagentes e insumos de processo

- Hidróxido de sódio – p.a.
- Cloreto de sódio – p.a.
- Álcool etílico – anidro – Usina São Francisco (Sertãozinho, SP).
- Acetona – p.a.
- Lestanol (Policosanol 99,5%), gentilmente cedido por Garuda International Inc., Lemon Cove, USA, e utilizado como padrão.
- Padrões de esteróis, álcoois, ácidos, triglicerídios, ésteres e hidrocarbonetos para análises cromatográficas (Sigma).

- Todos os reagentes químicos utilizados nas demais análises foram de grau p.a., de acordo com as especificações constantes dos métodos analíticos.
- Reagente de Grignard (Brometo de Etil Magnésio – 3M), gentilmente preparado pelo Professor Ronaldo Aloise Pilli, Instituto de Química, Unicamp.

3.1.3 Equipamentos

- Unidade piloto com reator de vidro encamisado de 2 litros, acoplado a um banho termostatizado MGW LAUDA RCS e RC6 e agitador pneumático.
- Banho térmico com glicerol e agitador magnético JANKE & KUNKEL – IKA REIZBAD HBR 250.
- Agitador magnético JANKE & KUNKEL – IKA COMBIMAG RCT.
- Moedor elétrico JANKE & KUNKEL – IKA WERK.
- Estufa com circulação de ar NOVA ÉTICA – N 480.
- Dessecador a vácuo VIDROLABOR – THERMEX.
- Espectrofotômetro UV/VIS, PERKIN ELMER Lambda 20.
- Mufla HERAEUS
- Cromatógrafo Gasoso Capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM.
- Rotavapor – BÜCHI – R 110.

- Balança analítica – OHAUS ADVENTURER.
- Lâmpada UV – ORIGINAL HANAU FLUOTEST.
- Vidrarias de uso rotineiro em laboratório.

3.2. Métodos

3.2.1 Métodos Analíticos

Devido à baixa solubilidade apresentada pelas amostras de cera de cana-de-açúcar, os métodos utilizados foram em geral modificados. As amostras foram dissolvidas em tolueno e utilizadas em pequenas quantidades, evitando deste modo a cristalização durante a realização das análises.

- Umidade e Matéria Volátil – *Método AOCS Ac 2-41*
- Cinzas – *Método AOCS Ch 4-91*
- Teor de Fósforo – *Método AOCS Ca 12-55*
- Índice de Saponificação – *Método AOCS Cd 3b-76, 2001*
- Índice de Acidez (IA) – *Método AOCS Ca 5a-40, 1997 – modificado conforme BENNET (1963)*. Aproximadamente 1,0 g de amostra foi dissolvida em 10 mL de tolueno, utilizando um banho aquecido e, após fusão completa da cera, adicionou-se 100 mL de álcool etílico neutralizado 95%. A mistura foi 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 usando a seguinte fórmula:

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

onde:

V = volume de NaOH 0,05 N, gasto na titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução

m = massa da amostra (g)

- Matéria Insaponificável (MI) – *Método AOCS Ca 6b-53, 2001 – modificado como segue*. Cerca de 0,5 g de amostra foi dissolvido em 10 mL de tolueno em banho aquecido e adicionado de 3 mL de solução de KOH 50% e 50 mL de álcool etílico 95%. A mistura foi mantida em refluxo por 8 horas e, posteriormente, transferida para um funil de separação de 250 mL, adicionando-se 50 mL de solução salina 5% e 50 mL de éter etílico. A fase etérea foi separada e, antes de ser transferida para um segundo funil, foi filtrada para a retirada de insolúveis concentrados na interface. Ao final de 5 extrações, as fases etéreas foram lavadas 3 vezes com porções de 20 mL de solução salina e, em seguida, mas 3 vezes com porções de 20 mL de solução de KOH 0,5 N, intercaladas com porções de água destilada. Após a terceira lavagem com KOH, a fração etérea foi lavada com água até teste de fenol negativo, transferida para um balão tarado e o solvente evaporado. O material foi seco em estufa a 105°C, até peso constante (“A”) e o resíduo foi dissolvido em 2 mL de éter etílico e 10 mL de álcool etílico 95%, previamente neutralizado e titulado com NaOH 0,02 N, para correção dos ácidos graxos livres (“B”). Foi feito um branco (“C”), usando-se o mesmo procedimento. A matéria insaponificável foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$MI \text{ (\%)} = \{[A - (B + C)] / m\} \times 100$$

onde:

A = massa do resíduo (g)

B = massa dos ácidos graxos (g)

C = massa do branco (g)

m = massa da amostra (g)

- Teor de Clorofila – Método AOCS Ch 4-91, 1997 - modificado conforme VIEIRA (2003). Cerca de 25 mg de amostra foram colocados em tubos e dissolvidos em diclorometano (CH_2Cl_2) utilizando um banho aquecido. Posteriormente, a amostra foi filtrada (papel filtro 80 g/cm^2), imediatamente antes das análises, em balões volumétricos e completado o volume para 5 mL. O teor de clorofila e pigmentos relacionados (principalmente feofitina), expresso em mg/kg de amostra, foi determinado através da absorção espectrofotométrica nos comprimentos de onda 630, 670 e 710 nm e calculado pela fórmula:

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

onde:

L = comprimento da cubeta (cm)

f = fator de diluição

A = leitura da absorbância em cada comprimento de onda

- Índice de Iodo segundo Wijs (II) – Método AOCS Cd 1d-92, 1997 – modificado conforme VIEIRA (2003). Aproximadamente 0,5 g de amostra foram dissolvidos em 7,5 mL de ciclohexano em banho aquecido. Após resfriamento, foram adicionados 7,5 mL de ácido acético e 25 mL de solução de cloro-iodo segundo Wijs. O frasco foi tampado, agitado e mantido no escuro por uma hora. Em seguida, foram adicionados 20 mL 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 como indicador. O índice de iodo, expresso em termos do número de miligramas de iodo absorvido por 100 miligramas de amostra (% de iodo absorvido), foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{II (mg/100 mg)} = (B - V) \times N \times 12,69 / m$$

onde:

B = volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N, utilizado na titulação do branco (mL)

V = volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N, utilizado na titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

m = massa da amostra (g)

- Índice de Peróxido (IP) – *Método AOCS Cd 8b – 90, 2001 – modificado como segue*. Em um erlenmeyer de 250 mL com tampa foram colocados aproximadamente 0,5 g de cera e 10 mL de tolueno. A cera foi dissolvida e, após o resfriamento, foram adicionados 50 mL de solução de ácido acético : isooctano (3:2) e 0,5 mL de KI saturado. O frasco foi tampado e agitado durante 1 minuto e, em seguida, adicionados rapidamente 30 mL de água destilada, 0,5 mL de lauril sulfato de sódio 10% e 0,5 mL de solução de amido 1%. A mistura foi titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N até desaparecimento da coloração cinza chumbo, tornando-se branca. O índice de peróxido, expresso em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{IP (meq/Kg)} = V \times N \times 1000 / m$$

onde:

V = volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N, utilizado na titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

m = massa da amostra (g)

3.2.2. Composição em álcoois graxos

Na determinação da composição dos álcoois graxos das amostras de cera utilizou-se o método de PINA et al. (1987), modificado por VIEIRA (2003), para aplicação em cera de cana, ao qual foram feitas algumas adequações: o solvente de diluição, éter etílico, foi substituído por hexano e o tempo de reação aumentado de 40 para 80 minutos. Neste método, as amostras são derivatizadas utilizando-se o reagente de Grignard, que reage com os grupamentos ésteres da cera, convertendo os ácidos graxos em álcoois terciários, enquanto que os álcoois graxos permanecem como álcoois primários. A reação, realizada sob condições anidras resulta em uma mistura, os produtos são separados por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa e os álcoois são analisados por cromatografia gasosa (CG). Para verificar a eficiência do reagente utilizado (eficiência da reação), os produtos são submetidos à análise por

cromatografia em camada delgada antes da realização da CCD preparativa. O método foi aplicado como segue (vide Figura 1):

- Derivatização usando o reagente de Grignard. Cerca de 15 mg de cera foram colocados em tubos com tampa, totalmente secos, solubilizados a quente em 2 mL de hexano anidro (destilado e saturado com sulfato de sódio) e adicionados do padrão interno eicosanol, dissolvido previamente no mesmo solvente. Em seguida, foram acrescentados um excesso estequiométrico do reagente de Grignard (1 mL de uma solução 3,0 M de brometo de etila e magnésio em éter etílico) e a mistura foi agitada em vórtex. Após 80 minutos, com agitação ocasional de 15 em 15 minutos, a reação foi interrompida através da adição de 0,3 mL de ácido acético, sendo necessário o resfriamento do tubo em banho de gelo (0°C) durante esta etapa. Adicionaram-se então 2,0 mL de solução aquosa de ácido bórico 0,4 M e, após agitação em vórtex, a amostra foi centrifugada por 5 min. A fase superior, contendo os álcoois primários e terciários, foi recolhida para um segundo tubo e lavada com 2 mL de solução de bicarbonato de sódio 2% : ácido bórico 0,4 M (1:1). O tubo foi levado para a centrífuga por 5 min e a fase superior foi recuperada. O solvente foi evaporado e os produtos derivados foram diluídos em 1 mL de éter etílico.

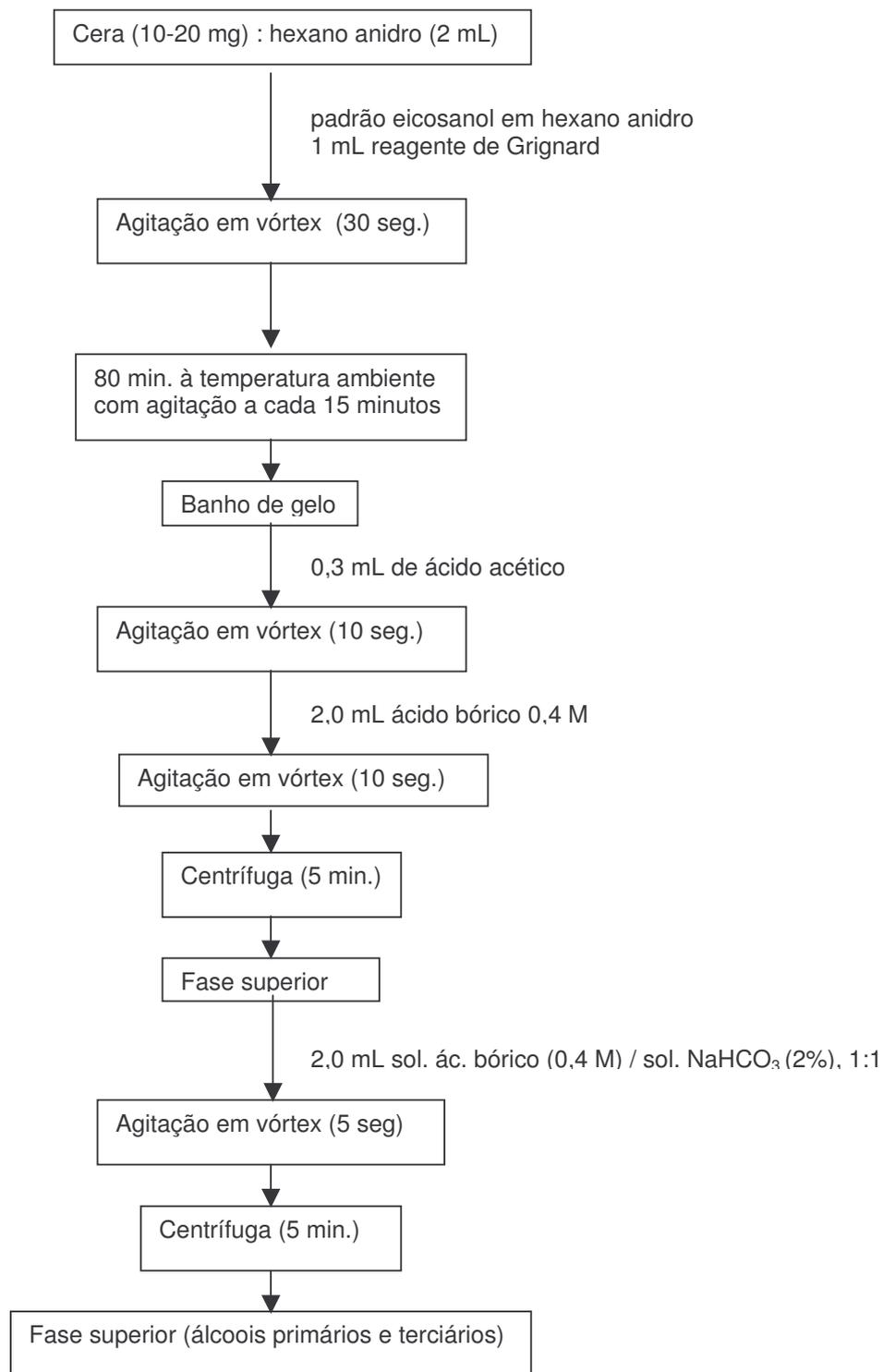


Figura 1. Esquema de derivatização da cera com o reagente de Grignard.

- Cromatografia em camada delgada (CCD). As análises de CCD foram realizadas em placas de sílica gel 20 x 20 cm, preparadas como segue: 60 g de sílica foram misturados com 140 mL de água destilada e aplicados em placas (espessura de 0,5 mm), as quais, depois de ativadas a 105°C por 30 minutos, foram deixadas em dessecador até serem utilizadas. Amostras de ceras derivatizadas foram aplicadas juntamente com os padrões e as placas eluídas utilizando-se o sistema de solventes hexano:éter etílico:ácido acético (60:40:0,5). As manchas foram localizadas vaporizando-se solução saturada de sulfato de cobre : ácido fosfórico (1:1), seguido do aquecimento a 200°C por 10 min. A identificação dos componentes foi baseada no tempo de retenção (Rf) de padrões autênticos (colesterol, eicosanol, ácido tetracosanóico, triestearina, estearil palmitato e esqualeno) eluídos nas mesmas condições. Para comprovação da eficiência da reação de derivatização foi preparada uma segunda placa, aplicando-se a amostra derivatizada e os padrões triestearina, estearil palmitato e esqualeno; a fase móvel utilizada foi hexano:éter etílico (94:6) e o revelador foi o mesmo utilizado anteriormente.

CCD preparativa foi realizada em placas similares às acima mencionadas, utilizando hexano:éter etílico:ácido acético (60:40:0,5) para eluição. As amostras de cera foram aplicadas ao longo da placa, deixando-se a extremidade para aplicação do padrão eicosanol. As manchas da amostra foram localizadas sob luz ultravioleta e raspadas. A sílica foi colocada em tubos e os componentes extraídos três vezes com 5 mL de clorofórmio, usando-se banho aquecido e agitação em vórtex. Após cada extração, o clorofórmio separado foi filtrado (papel filtro 80 g/cm²) diretamente em balões tipo pêra e o solvente foi evaporado até aproximadamente 1,5 mL. Para verificar a eficiência da separação, foram realizadas análises por CCD antes da análise por cromatografia gasosa.

- Cromatografia gasosa: Os álcoois foram analisados em cromatógrafo gasoso capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, equipado com detector de ionização de chama (FID) e injetor com split. Os componentes foram separados em uma coluna capilar LM-5 (polidifenildimetilsiloxano - 5% fenil e 95% metilpolisiloxano) - número 171200, L&M, dimensão = 30 m, diâmetro interno = 0,25 mm, espessura do filme LM-5 =

0,30 μm . Condições de operação empregadas: fluxo de coluna = 1,1 mL/min; temperatura do injetor e detector = 350°C; temperatura do forno = 270°C por 1 minuto, programada para 320°C a 10°C/min e mantida a 320°C por mais 20 minutos; gás de arraste: hélio. Amostras previamente dissolvidas em clorofórmio e filtradas foram injetadas na quantidade de 1 μL ; taxa split 1:50. A identificação dos picos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos componentes da amostra com o de padrões autênticos (eicosanol, 1-octacosanol e triacontanol) e também com os tempos de retenção do padrão Lestanol (99,5% de pureza), determinados nas mesmas condições. Foi preparada uma curva padrão com 4 concentrações diferentes de octacosanol. A quantificação foi feita a partir da equação da curva padrão.

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Preparação da amostra de cera bruta

Antes das análises de caracterização, a amostra de cera bruta fornecida pela Usina São Francisco, pesando aproximadamente 5 kg, foi quebrada em pequenos pedaços, seca em estufa com circulação de ar (60°C, 3 horas) e resfriada a 10°C. Posteriormente, foi moída utilizando-se um moinho Modelo PA 07C – Marca Siemsem (placa com furos de 8 mm), homogeneizada e guardada em freezer (-18°C).

3.3.2. Purificação da cera bruta – método do álcool etílico a quente

A purificação da cera bruta foi realizada utilizando o método proposto por MCLLOUD (1948), com algumas modificações. Em um reator de vidro encamisado com capacidade para 2,5 L, foram colocados 500 g de cera bruta e 2 L de etanol anidro. Foi acoplado um condensador e iniciou-se o aquecimento com agitação constante (120 rpm) até atingir a temperatura de ebulição do álcool. Passados 5 minutos, a agitação foi desligada e a mistura foi deixada em repouso por 2 minutos, para que a resina

decantasse. A fração solúvel em etanol foi separada e a resina foi submetida novamente a uma extração similar, utilizando-se porém somente 500 mL de álcool. Ao final, o etanol foi evaporado sob vácuo e os produtos resultantes foram secos em estufa com circulação de ar (60°C / 3 h) para determinação do rendimento. Após purificação de toda a cera necessária, a amostra obtida, denominada “cera purificada de cana-de-açúcar”, foi homogeneizada e armazenada em freezer (-18°C) até o início dos testes de caracterização e de obtenção do policosanol.

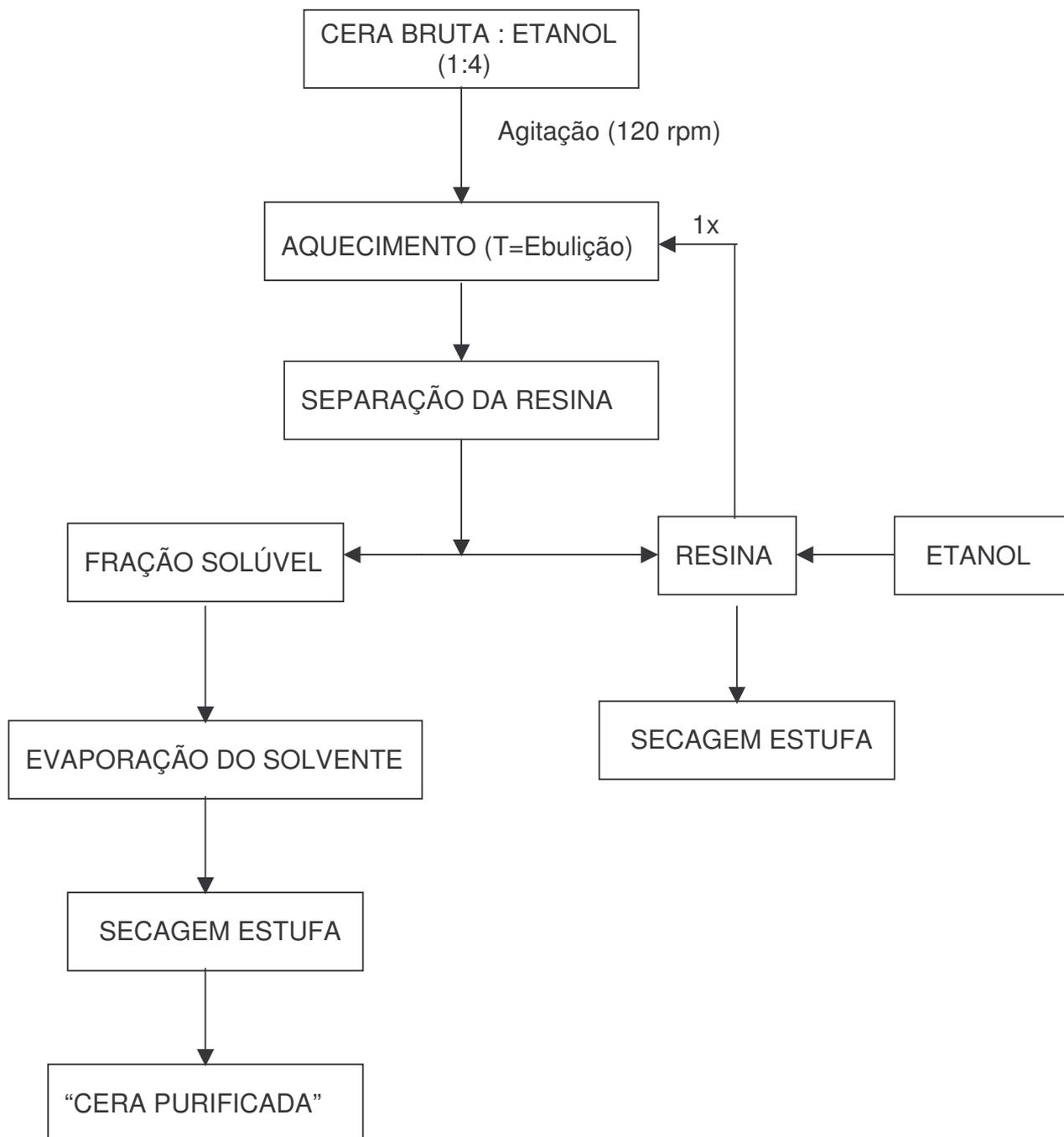


Figura 2: Esquema de purificação da cera bruta conforme metodologia proposta por MCLLOUD (1948).

3.3.3. Caracterização das matérias-primas: cera bruta e cera purificada

As matérias-primas, denominadas cera bruta e cera purificada, foram caracterizadas quanto aos seguintes parâmetros descritos em Métodos Analíticos: Umidade, Cinzas, Índice de Saponificação, Índice de Acidez, Matéria Insaponificável, Índice de Iodo, Teor de Clorofila, Índice de Peróxido e Teor de Fósforo. Também foram determinadas as composições em álcoois das amostras.

3.3.4. Estudo do processo de produção de policosanol em nível laboratorial

Conforme indicado nas patentes de LAGUNA GRANJA et al. (U.S. Patente 5.663.156, 1997 e U.S. Patente 5.856.316, 1999), o processo para obtenção do policosanol envolve inicialmente uma etapa de saponificação da cera de cana-de-açúcar, seguida de uma extração sólido-líquido do material saponificado e posterior purificação por cristalização.

3.3.4.1. Testes preliminares – reprodução da metodologia proposta nas patentes

Os testes preliminares visaram inicialmente reproduzir a metodologia proposta nas patentes citadas anteriormente (Figura 3 - pág 53). Os ensaios de saponificação da cera bruta foram primeiramente realizados em um béquer e posteriormente em um balão, acoplado a um condensador de serpentina e um termômetro, ambos mantidos em um banho termostático e com agitação. Foram utilizadas quantidades de 20 g de cera bruta e testados: tempo de 5 horas, temperaturas de 80°C, 100°C e 120°C e concentrações de NaOH de 10% e 20% em relação à cera bruta. Após fusão completa da cera, o álcali foi adicionado na forma de soluções aquosas extremamente concentradas (relação NaOH : água de 1 : 0,7 (p/v)) e a reação mantida nas temperaturas e tempo determinados. Além do NaOH, avaliou-se também o KOH na concentração de 10%, tempo de 5 horas e temperatura de 100°C. Após a reação, a cera

saponificada, previamente separada em alguns dos ensaios realizados, foi colocada em um extrator tipo Butt e submetida a uma extração sólido-líquido por um período de 10 horas. Testaram-se os solventes etanol, hexano e acetona, mantendo-se a relação cera bruta : solvente em 1 : 20 (p/v). A micela coletada no balão foi resfriada à temperatura ambiente e em seguida a 10°C. A fração insolúvel precipitada foi separada por filtração e posteriormente seca em estufa (60°C/3 h) para determinação do rendimento (g) do produto obtido (mistura de álcoois).

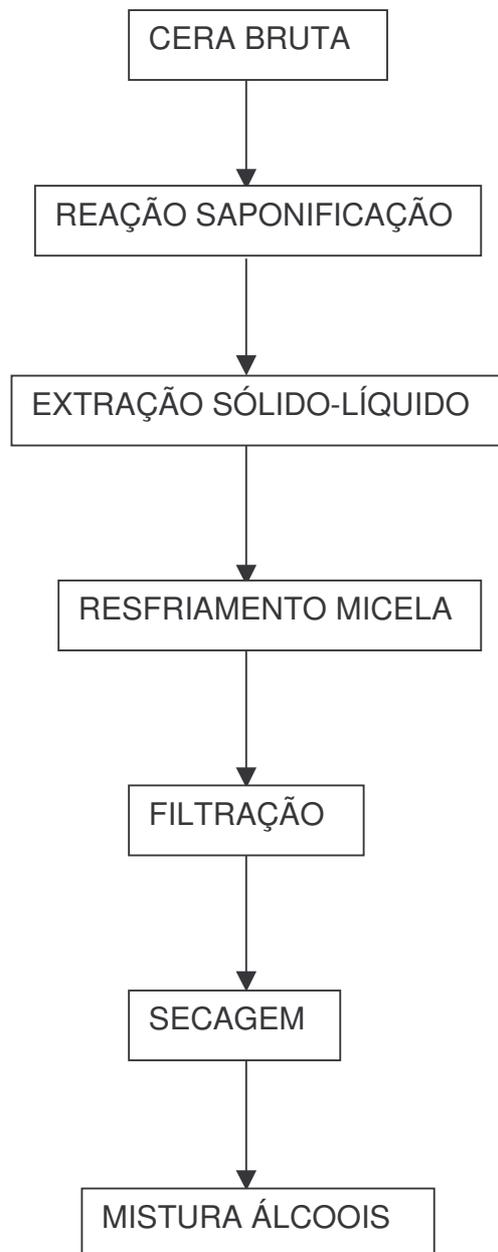


Figura 3: Esquema dos testes preliminares, realizados para obtenção da mistura de álcoois, conforme a metodologia proposta nas patentes de LAGUNA GRANJA et al. (U.S. 5.663.156, 1997 e U.S. 5.856.316,1999).

3.3.4.2. Estudo das etapas envolvidas no processo proposto nas patentes e desenvolvimento de procedimentos alternativos.

Em vista das dificuldades encontradas e dos resultados obtidos nos testes preliminares para a obtenção da mistura de álcoois, a proposta foi desenvolver um processo com o objetivo de estabelecer as condições mais adequadas para cada etapa, tomando como base, além do rendimento, os aspectos práticos inerentes ao processo, como: custo dos reagentes, dificuldade/toxicidade no manuseio/utilização das matérias-primas, solventes e produtos, além do tempo e complexidade operacional envolvidos.

3.3.4.2.1 – Etapa de saponificação

O estudo da reação de saponificação foi realizado com o objetivo inicial de solucionar os problemas de agitação observados durante a realização dos testes preliminares. Nestes ensaios, foi utilizado um sistema composto de um balão de duas bocas, adaptado a um condensador e a um termômetro, e mantido em um banho termostático com agitação magnética. Foram utilizados 20 g de cera bruta e testados os volumes indicados de soluções de NaOH, aquosa e alcoólica, relacionados na Tabela 8. A reação foi mantida por um período de 5 horas à temperatura de 100°C.

Tabela 8. Relação de cera e soluções de NaOH (aquosas e alcoólicas), testadas durante os ensaios de saponificação da cera bruta.

Nº Teste	Massa de cera bruta (g)	Solução de NaOH		
		NaOH (g)	Água (mL)	Álcool (mL)
1	20,0	2,0	1,5	-
2	20,0	20	3,0	-
3	20,0	2,0	6,0	-
4	20,0	2,0	10,0	-
5	20,0	2,0	2,0	5,0
6	20,0	2,0	2,0	10,0
7	20,0	2,0	2,0	20,0

3.3.4.2.1.1. Otimização da etapa de saponificação da cera purificada

Definidas as condições operacionais da etapa de saponificação, o estudo da otimização do processo foi realizado em um sistema composto de um balão de duas bocas, adaptado a um condensador e a um termômetro, no qual foram colocados 50 g de cera purificada. O balão foi colocado em um banho termostatizado e mantido com agitação constante por meio de um agitador magnético. A temperatura da reação foi monitorada e mantida constante (80°C). Após fusão completa da cera, a reação de saponificação foi realizada (tempos e concentrações molares, definidos no desenho experimental - Tabela 9) utilizando-se sempre o mesmo volume de solução de NaOH (50 mL). Após a reação, foram separadas porções de cera saponificada (equivalentes a 10 gramas de cera purificada) e a mistura de álcoois foi extraída utilizando o procedimento desenvolvido e descrito em 3.3.4.2.2.5. (separação com solução salina e etanol).

Os fatores considerados na etapa de saponificação (variáveis independentes) foram o tempo de processo e a concentração da solução alcoólica de NaOH. As variáveis dependentes (respostas) foram o rendimento (%) da mistura de álcoois após a extração e o teor de álcoois (%) do produto obtido (pureza).

O delineamento estatístico adotado foi um planejamento central composto rotacional com duas variáveis independentes (fatorial completo 2^2), envolvendo 11 ensaios, dos quais 3 se referem a repetições do ponto central, para determinação do erro puro (BARROS NETO et al., 1996).

As variáveis independentes e seus níveis de variação estão indicados na Tabela 9 e os valores codificados e reais dessas variáveis, especificados para cada ensaio de acordo com o delineamento estatístico adotado, estão na Tabela 10.

A numeração dos ensaios é apenas uma forma conveniente de identificar as várias combinações de níveis e nada tem a ver com a ordem em que os experimentos foram efetivamente realizados. Os ensaios foram efetuados em ordem totalmente aleatória para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados (BARROS NETO et al., 1996).

Tabela 9. Variáveis independentes e seus níveis de variação para o planejamento experimental da reação de saponificação de cera purificada de cana-de-açúcar.

Variável Independente	Nível de variação				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tempo (min)	60	95	180	265	300
[NaOH] n ^o moles/L	1	2,2	5	7,8	9

Tabela 10: Delineamento experimental do planejamento fatorial completo aplicado à otimização da reação de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar.

Ensaio	Variáveis independentes			
	X1	X2	tempo (min)	[NaOH] (M)
1	-1	-1	95	2,2
2	+1	-1	265	2,2
3	-1	+1	95	7,8
4	+1	+1	265	7,8
5	-1,41	0	60	5
6	+1,41	0	300	5
7	0	-1,41	180	1
8	0	+1,41	180	9
9	0	0	180	5
10	0	0	180	5
11	0	0	180	5

X1 = Tempo em minutos e X2 = Molaridade da solução alcoólica de NaOH (moles / L).

3.3.4.2.1.2. Determinação das condições mais favoráveis da etapa de saponificação

Os ensaios de otimização da reação de saponificação não foram conclusivos e assim foram realizados alguns testes adicionais para determinação das condições mais favoráveis tecnicamente para esta etapa.

Utilizando-se o mesmo sistema preparado para os testes de otimização e, mantendo-se a proporção de cera purificada e solução hidro-alcoólica de NaOH em 1:1 (p/v), foram testadas concentrações 2,0 M e 1,5 M e tempo de 60 min e posteriormente concentração de 2,0 M e tempos de 30 min e 15 min. Após a saponificação, a mistura de álcoois foi extraída utilizando-se o procedimento desenvolvido e composto das etapas descritas em 3.3.4.2.2.5 (separação com solução salina e etanol).

3.3.4.2.2. Etapa de separação da mistura de álcoois da cera saponificada para obtenção do concentrado de álcoois graxos

Para a extração da mistura de álcoois da cera saponificada foram realizados vários testes até definição do procedimento considerado o mais prático e eficiente para a obtenção de um produto com maior rendimento (%) e teor em álcoois (%) (pureza).

Nos ensaios de extração dos álcoois, a cera foi previamente saponificada utilizando-se as condições definidas como as mais favoráveis para esta etapa e utilizadas quantidades de cera saponificada equivalente a 10g de cera purificada.

3.3.4.2.2.1. Separação da mistura de álcoois utilizando-se extração sólido-líquido

Neste ensaio, a cera saponificada (equivalente a 10 g de cera purificada) foi colocada em um cartucho e extraída com etanol em um extrator tipo Butt, mantendo-se

a relação cera purificada:etanol em 1:20 (p/v), pelo período de 10 horas. Após o tempo determinado, a micela coletada no balão foi resfriada à temperatura ambiente e em seguida a 10°C. A fração insolúvel precipitada foi separada por filtração e posteriormente seca em estufa (60°C/3 h) para determinação do rendimento (%) da mistura de álcoois.

Observou-se, durante a extração sólido-líquido, que certa quantidade de sais eram arrastados juntamente com os álcoois e assim foram realizados alguns testes com duas e três extrações sólido-líquido, sucessivas, da mesma amostra. Nestes processos, o produto obtido de uma extração anterior e antes de ser submetido à secagem, foi colocado em novo cartucho e extraído por um período de 5 horas.

3.3.4.2.2. Separação da mistura de álcoois utilizando-se filtrações a quente

Uma vez que não houve reprodutibilidade nos ensaios de extração sólido líquido, novos testes foram propostos. Nestes ensaios, a cera saponificada (equivalente a 10 g de cera purificada) foi adicionada de etanol (relação cera purificada:etanol igual a 1:20) e a mistura foi mantida sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de ebulição. A solução resultante foi filtrada a quente para separação dos sais de ácidos graxos insolúveis (sabões) e o permeado obtido foi resfriado à temperatura ambiente e em seguida a 10°C. Em seguida, a fração insolúvel foi separada por filtração e seca em estufa (60°C/3 h) para determinação do rendimento (%) da mistura de álcoois.

Foram testadas também duas e três filtrações sucessivas da solução a quente antes de submetê-la ao resfriamento e filtração a frio.

3.3.4.2.2.3. Separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina

Foram utilizadas metodologias alternativas como a denominada “salting out”, para a separação dos álcoois da cera saponificada. Neste processo, a adição de cloreto de sódio provoca um aumento da força iônica do meio, diminuindo a solubilidade dos compostos não polares, que precipitam e são separados por filtração (MARQUES, 2004).

Com base na metodologia proposta, a cera saponificada (equivalente a 10 g de cera purificada) foi adicionada de 150 mL de solução salina 10% e a mistura foi aquecida em chapa com agitação magnética, até temperatura de ebulição. Passados 5 minutos, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e posteriormente a 10°C. O sobrenadante formado foi filtrado a vácuo e o material retido no filtro foi seco em estufa (60°C/6 h) para determinação do rendimento (%) da mistura de álcoois e da pureza (%).

Foram avaliados os efeitos de adições sucessivas de solução salina à cera saponificada. Neste procedimento, o produto resultante da primeira extração e, antes de ser seco em estufa, foi adicionado de igual volume de solução salina e o processo repetido.

3.3.4.2.2.4. Separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina e etanol (extração sólido-líquido)

Considerando que o material obtido após a extração com solução salina concentrou os álcoois presentes na cera, mas o produto resultante apresentou baixa pureza, foram realizados alguns testes de extração sólido-líquido com o material resultante desta etapa. Assim, o material obtido conforme o item 3.3.4.2.2.3., utilizando-se uma única lavagem com solução salina, e antes de ser seco em estufa, foi submetido à extração sólido-líquido com etanol, em extrator tipo Butt (relação cera purificada:etanol

igual a 1:20 (p/v)), durante o período de 5 horas. Após o período determinado, a micela coletada foi resfriada a 10°C e filtrada a vácuo, e o material retido no filtro foi seco em estufa (60°C/3 h) para determinação do rendimento (%) da mistura de álcoois e pureza (%).

3.3.4.2.2.5. Separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina e etanol

Procurando alternativas para o processo de extração sólido-líquido, em uma tentativa de minimizar o tempo, foram realizados alguns testes em que o produto resultante após uma única lavagem com solução salina e, antes de ser submetido à secagem, foi dissolvido diretamente em etanol. Nestes ensaios, após a adição do solvente (relação cera purificada:etanol de 1:20 (p/v)), a mistura foi aquecida sob agitação constante até ebulição (78 - 79°C). Em seguida, interrompeu-se o aquecimento e a agitação, e a solução foi mantida em repouso por 1 minuto, tempo suficiente para que houvesse decantação de traços de resina, remanescente do processo de purificação, e outras impurezas. Após o tempo determinado, o material decantado foi separado e a solução resultante resfriada à temperatura ambiente e posteriormente a 10 °C, ficando nesta temperatura por mais 1 hora. O material precipitado foi separado por filtração e seco em estufa (60°C/3 h) para determinação do rendimento (%) da mistura de álcoois graxos e da pureza (%).

3.3.4.3. Processo definido para obtenção do “policosanol 50”

Utilizando-se as condições das etapas de saponificação e de extração previamente definidas em 3.3.4.2.1.2 (saponificação nas condições mais favoráveis) e 3.3.4.2.2.5 (separação com solução salina e etanol) e considerando os resultados, foi obtida a mistura de álcoois denominada “policosanol 50” (Figura 4).

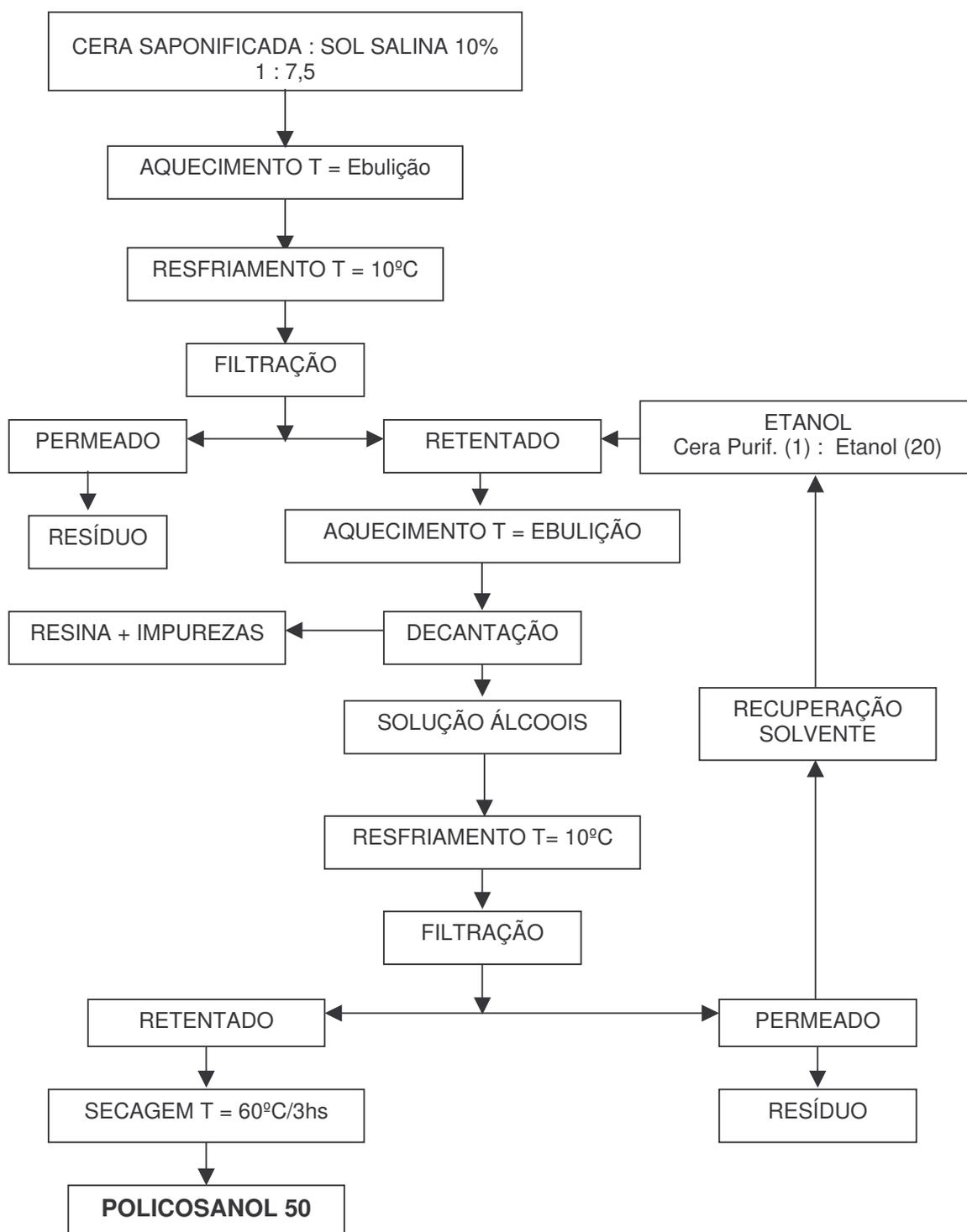


Figura 4. Fluxograma do processo de separação dos álcoois graxos de cera purificada saponificada, para obtenção do “policosanol 50’

3.3.4.4. Purificação dos álcoois graxos - obtenção do “policosanol 90”.

Objetivando obter um produto com alto teor em álcoois (pureza), foram realizados alguns ensaios de purificação do produto obtido de acordo com o item 3.3.4.3.. Em um balão acoplado a um condensador e com agitação, foram colocados o “policosanol 50” e uma quantidade definida de acetona, em uma relação de 1:30 (p/v). A mistura foi aquecida com agitação constante, utilizando-se uma chapa aquecedora, e mantida em refluxo por 30 minutos. Posteriormente, o conteúdo foi filtrado a quente e a solução obtida foi deixada resfriar a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}$) e, posteriormente, a 10°C , ficando nesta temperatura por mais 1 hora. O material precipitado foi filtrado e a amostra foi seca em estufa com circulação de ar ($60^{\circ}\text{C}/6\text{ h}$) para determinação do rendimento (%) da mistura de álcoois e da pureza (%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparação da cera bruta

A amostra de cera bruta, seca em estufa para retirada dos traços de umidade superficial, manteve suas características visuais inalteradas, ou seja, aspecto heterogêneo e coloração verde escura com partes pretas. Segundo BALCH (1945), a cor da cera bruta pode variar de marrom escuro até esverdeado escuro, quase preto, dependendo da variedade de cana, do método utilizado na manufatura do açúcar, do tempo decorrido entre a obtenção das tortas de filtro e extração da cera e dos solventes utilizados na extração. Conforme o mesmo autor, a cera de cana-de-açúcar, tal como obtida das tortas de filtro, contém uma fração “resinosa”, insolúvel em álcool, que é em grande parte responsável pela cor escura que caracteriza a cera proveniente desta fonte.

4.2. Purificação da cera bruta

Em geral, os processos de purificação encontrados na literatura separam a cera bruta em três frações: cera purificada, óleo e resina. Neste estudo, porém, após realização dos testes preliminares utilizando a cera bruta (vide item 3.3.4.1) constatou-se a necessidade de retirada da resina. Neste contexto e, por facilidade operacional, o processo de purificação utilizado separou somente a resina. O produto resultante composto das frações cera e óleo foi denominado cera purificada. A Tabela 11 apresenta os rendimentos obtidos no processo de purificação realizado.

Neste trabalho, optou-se pela utilização do álcool etílico, pela sua disponibilidade nas usinas e, também, por possuir ponto de ebulição próximo ao de fusão da cera, garantindo total solubilidade da mesma a 80°C. Além disso, a cera e o óleo mantiveram-se na fase líquida durante todo o processo, permitindo que a resina decantada fosse separada com facilidade.

Tabela 11. Rendimento em cera purificada e resina obtidos no processo de purificação da cera bruta (base seca), em escala piloto, utilizando o processo do álcool a quente.

	Rendimento (%)	Desvio padrão
Cera purificada	55,1	9,12
Resina	42,8	5,53

MCCLOUD (1948) utilizou álcoois etílico, metílico, isopropílico e n-propílico na purificação da cera bruta. O autor reporta que utilizando álcool metílico foi necessário aplicar pressão sobre o sistema para manter a cera em solução e o solvente na fase líquida e que, no processo de purificação usando álcool isopropílico, os rendimentos em cera purificada e resina foram de 70% e 30% respectivamente.

GARCIA et al. (1988) relataram um processo em que a fração oleosa foi separada com etanol a frio e a resina foi separada por sedimentação com etanol a quente, num procedimento composto por cinco lavagens da resina. Nesta referência, porém, não foram fornecidos dados de rendimento. Os mesmos autores citaram também o fracionamento utilizando acetona, por um processo similar à recuperação de parafina da fração pesada do petróleo, com rendimento de 42,1% em cera refinada, 39% em óleo e 16,3% em resina.

Em outra referência, PATURAU (1989) cita o trabalho desenvolvido por MANOAR RAO (1980), que descreve um processo de refino utilizando a cera bruta de cana-de-açúcar, extraída de uma planta de Ravalgaon Sugar Farm Ltd. - Índia. Neste estudo, a cera bruta com coloração preta, textura macia e odor desagradável é purificada com álcool isopropílico e branqueada com ar. MANOAR reporta que usando este processo obteve 30-40% de cera refinada, 25-30% de óleo e 29-30% de resina.

Em todas as referências citadas, os dados de rendimento em resina foram menores do que os observados neste estudo e, provavelmente reflitam os processos de purificação utilizados. Nestas referências, os autores ou utilizaram solventes com maior ponto de ebulição que o etanol, ou empregaram pressão sobre o sistema, ou ainda, usaram um maior número de extrações com a resina. Assim, pode-se concluir que nos processos referenciados houve uma maior solubilização e arraste de cera juntamente com o solvente, contribuindo para o menor rendimento em resina encontrado.

Neste trabalho, a cera purificada obtida após evaporação do solvente e secagem em estufa (60°C/3 h) apresentou coloração verde escuro e aspecto liso-brilhante, e a resina, coloração verde muito escura, quase preta, com aspecto de piche quando líquida. Segundo MEADE (1967), as resinas são polímeros de consistência cérea, que contém complexos metálicos formados durante a clarificação do caldo no processamento da cana.

4.3. Caracterização das matérias-primas: cera bruta e cera purificada

4.3.1. Índices analíticos

Após o processo de purificação, as ceras bruta e purificada foram caracterizadas e os resultados são apresentados na Tabela 12. Os valores, com exceção do ponto de fusão, são referentes à média de cinco repetições.

Tabela 12. Características físico-químicas das ceras de cana-de-açúcar bruta e purificada.

Análise	Cera bruta	Desvio padrão	Cera purificada	Desvio padrão
Índice de Acidez (mg KOH/g)	27,3	0,99	39,6	1,39
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	105,2	3,01	118,3	1,22
Matéria Insaponificável (%)	32,4	2,22	50,8	2,89
Umidade (%)	16,7	1,16	5,3	0,28
Cinzas (%)	2,4	0,05	0,3	0,04
Fósforo (mg/kg)	857,2	11,76	204,8	7,11
Clorofila (mg/kg)	135,5	5,75	152,8	3,55
Índice de lodo – Wijs (mg/100 g)	33,3	0,57	55,7	0,32
Índice de Peróxido	248,1	5,86	100,5	3,10
Ponto de Fusão	71,6	-	70,2	-

Os valores de índice de acidez e índice de saponificação apresentados pela cera bruta concordam com alguns dos dados reportados na literatura. BUTTAR et al. (1999), citados por VIEIRA (2003), encontraram valores de índice de acidez variando de 29,0 a 37,4 mg de KOH/g em amostras extraídas com solventes apolares como hexano, tolueno e clorofórmio; já o índice de saponificação destas mesmas amostras variou de 109,4 a 115,3 mg de KOH/g. VIEIRA (2003) encontrou valores um pouco maiores para as amostras analisadas: índice de acidez de 52,36 mg de KOH/g para a cera bruta de cana orgânica e 44,52 mg de KOH/g para a cera bruta de cana queimada e índices de

saponificação de 123,54 mg de KOH/g e 119,69 mg de KOH/g para amostras de cera bruta de cana queimada e orgânica respectivamente.

Nos valores apresentados na Tabela 12, pode-se observar que a cera purificada apresenta maior índice de acidez que a cera bruta. Isso parece indicar que o processo de purificação empregado concentrou na cera purificada os ácidos graxos livres presentes na fração óleo, ou ainda, que o processo promoveu a hidrólise de alguns ésteres e triglicerídios presentes na cera. Segundo BALCH (1969), o conteúdo de ácidos livres da cera bruta pode variar consideravelmente, refletindo as condições sob as quais a torta de filtro é manipulada antes e durante a extração, assim como as condições de armazenamento da cera bruta antes do seu fracionamento.

Em geral, os valores de índice de saponificação da cera purificada encontrados na literatura se referem à fração dura de cera bruta e quase sempre são menores que os observados neste trabalho. Observa-se também que os valores disponíveis nas referências variam em uma ampla faixa e refletem todas as possíveis variáveis presentes, desde o processamento do caldo de cana para obtenção das tortas de filtro, até o tipo de solvente e condições estabelecidas nas etapas de extração e fracionamento realizados. Assim, conclui-se que a comparação de valores deveria levar em consideração o conjunto de fatores envolvidos. WARTH (1947), por exemplo, compilou dados de cera purificada e semipurificada de várias procedências e os valores de índice de saponificação variaram de 54 a 148 mg de KOH/g. Em outra referência, o mesmo autor cita o valor médio de 96 mg de KOH/g para o índice de saponificação de numerosas espécies de cera semipurificada. VIEIRA (2003) estudou um processo de separação da fração dura da cera bruta utilizando hexano e encontrou valores de índice de saponificação para a cera purificada de 77,85 mg de KOH/g para a cera de cana orgânica e 76,50 mg de KOH/g para a cera de cana queimada e GARCIA et al. (1998) reportaram valores variando de 90 a 100 mg de KOH/g para amostras de cera refinada com álcool e valores de 150 mg de KOH/g para a fração óleo separada.

A cera purificada apresentou uma porcentagem maior de matéria insaponificável quando comparada à cera bruta, indicando que houve uma concentração da fração éster na amostra como resultado do processo de purificação realizado.

Analisando-se a Tabela 12, pode-se observar que o teor de fósforo e o conteúdo de cinzas sofreram um considerável decréscimo como resultado do processo de purificação realizado. WIJNBERG (1909), citado por BALCH (1969), reporta que grande parte do conteúdo de fósforo está associado à fração resinosa da cera, junto com praticamente todos os outros constituintes minerais encontrados.

A análise dos resultados mostra ainda que o processo de purificação promoveu um aumento no índice de iodo, indicando possivelmente que a fração mais insaturada pode ter sido concentrada na fração solúvel no álcool quente, sendo esta a fração responsável também pelo menor valor observado para o ponto de fusão da cera purificada.

O índice de peróxido apresentado pela cera purificada foi menor que aquele observado para a cera bruta. Estes resultados indicam que, provavelmente, parte dos compostos oxidados migraram para a fração resinosa retirada no processo de purificação.

Comparando-se os teores de clorofila das amostras de cera bruta e purificada pode-se dizer que o processo de purificação não foi eficiente para a eliminação deste composto. Segundo WARTH (1947), desde que o comportamento da clorofila é semelhante ao das substâncias cero-oleosas, ela não é facilmente separada.

Observa-se que a cera bruta, quando exposta ao ambiente, acumula umidade superficial devido provavelmente à característica higroscópica do material, sendo esta a causa do alto valor de umidade apresentado pelas amostras analisadas.

4.3.2. Composição em álcoois graxos

Os álcoois presentes nas ceras bruta e purificada foram analisados após a derivatização das amostras utilizando-se o reagente de Grignard e, a quantificação destes compostos foi realizada considerando que todos os álcoois graxos apresentem o mesmo fator de resposta ao detector que o octacosanol. Sendo assim, foi construída uma curva de calibração para o octacosanol utilizando-se o eicosanol (C₂₀) como padrão interno.

A Figura 5 mostra a curva padrão (octacosanol) construída para quantificação dos álcoois graxos presentes nas amostras de cera de cana-de-açúcar.

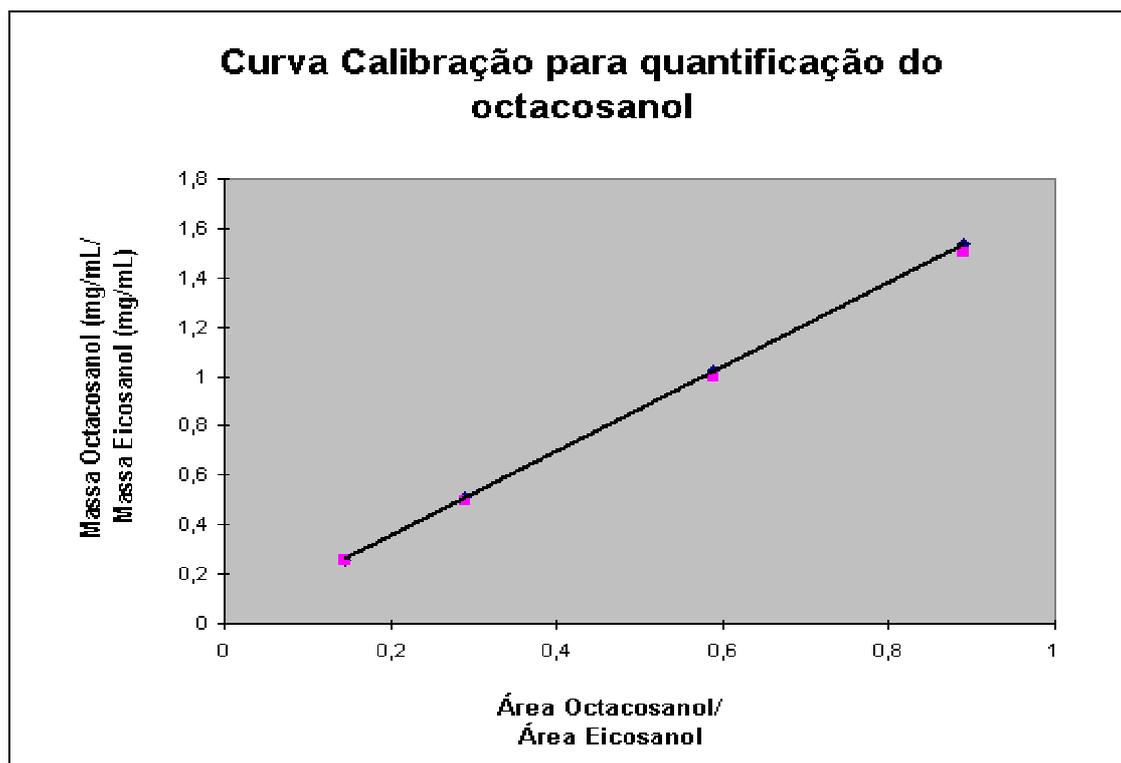


Figura 5. Curva padrão para a quantificação dos álcoois presentes nas amostras de cera de cana-de-açúcar.

A curva foi linear na faixa estudada e o coeficiente de correlação obtido ($R=0,9999$) para a equação $Y = 1,6729 X + 0,012$, onde Y é a relação de massa entre o octacosanol (C_{28}) e o eicosanol (C_{20}) e X a relação de áreas entre estes dois componentes, indica uma correlação adequada.

Após a reação de derivatização, os produtos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) para verificar a eficiência da reação. Foi utilizado o sistema de solventes hexano:éter etílico (96:4) e o resultado da hidrólise alcalina pode ser visualizado na Figura 6.

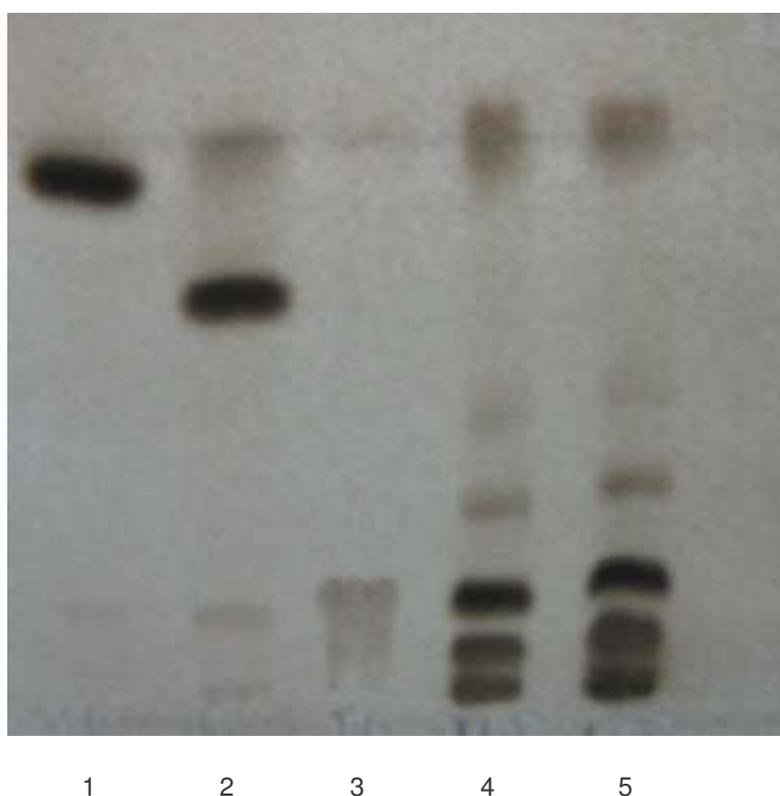


Figura 6. Verificação da eficiência da reação de derivatização utilizando-se o reagente de Grignard. 1: Padrão hidrocarboneto (esqualeno), 2: Padrão éster de cera (estearil palmitato), 3: Padrão triacilglicerol (triestearina), 4: Amostra de cera bruta derivatizada, 5: Amostra de cera pura derivatizada. Sistema de eluição: hexano/éter etílico (94:6).

A análise por CCD mostrou que as amostras derivatizadas não apresentaram bandas escuras referentes aos ésteres de cera, indicando que a reação, realizada no tempo e temperatura determinados, promoveu a conversão total dos ésteres em álcoois.

Na Tabela 13, apresenta-se a composição em álcoois graxos (proporção relativa) das amostras de cera de cana-de-açúcar bruta e purificada.

Tabela 13. Composição em álcoois graxos totais das amostras de cera de cana-de-açúcar bruta e purificada pelo método do álcool a quente.

Álcool Graxo	% relativa			
	Cera Bruta	Desvio padrão	Cera purificada	Desvio padrão
24 : 0	2,6	0,14	1,8	0,18
26 : 0	18,6	1,73	15,3	2,31
27 : 0	3,7	0,79	3,1	0,22
28 : 0	57,3	2,97	59,3	1,80
29 : 0	7,4	0,69	9,7	1,10
30 : 0	6,6	2,05	8,2	0,39
32 : 0	3,8	0,79	2,6	0,18
34 : 0	-	-	-	-

média de 3 repetições

As amostras de cera bruta e purificada apresentaram álcoois graxos saturados de 24 a 32 carbonos, sendo o octacosanol ($C_{28}H_{57}OH$) o principal componente.

Os resultados mostraram que as composições em álcoois graxos dos dois tipos de cera são próximas.

Nas Figuras 7 e 8, mostram-se os cromatogramas da composição em álcoois graxos presentes ceras de cana-de-açúcar bruta e purificada pelo processo do álcool a quente.

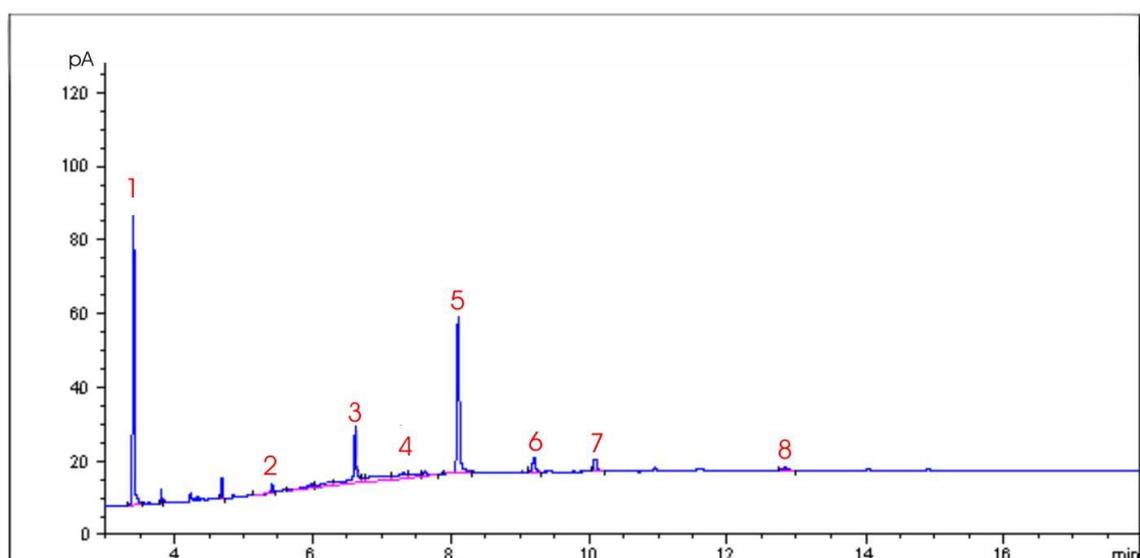


Figura 7. Cromatograma dos álcoois graxos totais da cera bruta de cana-de-açúcar após derivatização utilizando-se o reagente de Grignard.

1: Padrão primário eicosanol ($C_{20}:0-OH$); 2: tetracosanol ($C_{24}:0-OH$); 3: hexacosanol ($C_{26}:0-OH$); 4: heptacosanol ($C_{27}:0-OH$); 5: octacosanol ($C_{28}:0-OH$); 6: nonacosanol ($C_{29}:0-OH$); 7: triacontanol ($C_{30}:0-OH$); 8: dotriacontanol ($C_{32}:0-OH$).

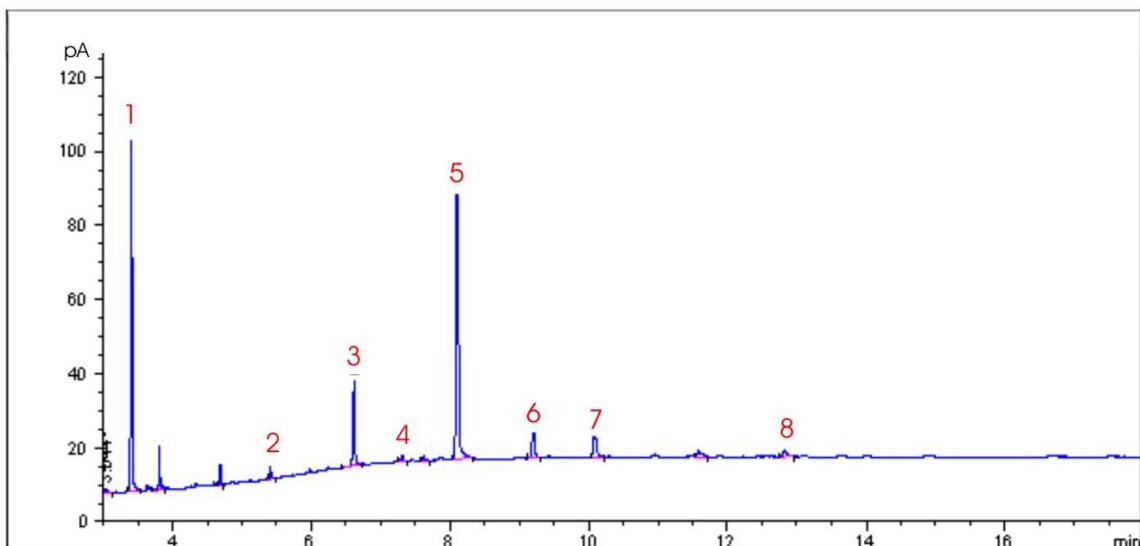


Figura 8. Cromatograma dos álcoois graxos totais da cera purificada de cana-de-açúcar após derivatização utilizando-se o reagente de Grignard, 1: Padrão primário eicosanol (C20:0-OH); 2: tetracosanol (C24:0-OH); 3: hexacosanol (C26:0-OH); 4: heptacosanol (C27:0-OH); 5: octacosanol (C28:0-OH); 6 :nonacosanol (C29:0-OH); 7: triacontanol (C30:0-OH); 8: dotriacontanol (C32:0-OH).

Na Tabela 14, observa-se os teores de octacosanol das amostras de cera bruta e purificada, determinados a partir da curva padrão construída utilizando o eicosanol (C20) como padrão interno.

Tabela 14. Teor de octacosanol encontrado nas amostras de cera bruta e purificada de cana-de-açúcar

	Teor de octacosanol (%)	Desvio padrão
Cera bruta	12,4	1,50
Cera purificada	17,7	0,99

média de 3 repetições

Considerando que todos os álcoois presentes nas amostras apresentem o mesmo fator de resposta ao detector que o octacosanol, a porcentagem de álcoois livres e esterificados para as ceras bruta e purificada pode ser calculada com base na porcentagem relativa deste álcool. Assim, os teores de álcoois totais das ceras bruta e purificada seriam respectivamente 21,7% e 29,9%. VIEIRA (2003) encontrou teores de álcoois de 19,25% e 20,14% para as ceras brutas e 28,35% e 33,20% para as ceras purificadas de canas orgânica e queimada, respectivamente. Em outro estudo, NUISSIER et al. (2002), utilizando matérias-primas e métodos de extração e purificação diferentes dos utilizados neste trabalho, encontraram valores de 32% de álcoois totais para as amostras analisadas.

4.4. Estudo do processo de produção de policosanol em nível laboratorial

4.4.1. Testes preliminares – reprodução da metodologia das patentes

A reprodução da reação de saponificação proposta nas patentes (LAGUNA GRANJA, U.S. Patente 5.663.156, 1997 e U.S. Patente 5.856.316, 1999) foi realizada com algumas dificuldades. No entanto, como o objetivo era o estudo de cada fase envolvida no processo de obtenção do policosanol, vários ensaios foram realizados. Em todos os testes onde o álcali foi dissolvido em quantidade mínima de água (somente o

suficiente para dissolução), não foi possível manter o sistema em agitação, independentemente do tipo e concentração do álcali, tempo e temperatura testados. Observou-se que, com os equipamentos disponíveis, mesmo utilizando temperaturas de 120°C, a agitação da massa saponificada cessava com o passar do tempo, devido ao aumento da viscosidade do sistema, e o ensaio somente podia ser concluído agitando-se manualmente o material.

Apesar das dificuldades encontradas na etapa de saponificação, algumas amostras obtidas nesta fase foram utilizadas na etapa subsequente de extração da mistura de álcoois.

A reprodutibilidade da etapa de extração com etanol foi muito difícil. Os rendimentos obtidos variaram de 16,0% a 35,2%, utilizando as mesmas condições. Além disso, foi notado, durante esta etapa, que grande quantidade de resina, presente inicialmente na cera bruta, era arrastada juntamente com a mistura de álcoois e ficava aderida nas laterais e fundo do balão, contaminando a fração de interesse.

Após secagem em estufa para determinação do rendimento, a mistura de álcoois resultante apresentou coloração verde amarelado escuro e aspecto heterogêneo.

Os resultados obtidos nos testes de extração com hexano, indicaram que este solvente não é adequado. Decorridos aproximadamente 2 h de extração, os poros do cartucho ficaram obstruídos e ocorreu o transbordamento do solvente.

Os ensaios de extração com acetona ocorreram sem dificuldades, entretanto, considerando o baixo rendimento obtido (13,8%), a utilização deste solvente foi descartada inicialmente.

4.4.2 – Estudo das etapas envolvidas no processo proposto nas patentes para obtenção do policosanol e desenvolvimento de procedimentos alternativos.

4.4.2.1 – Etapa de saponificação

Tentando solucionar os problemas de agitação observados nos testes preliminares, foram testadas soluções hidroalcoólicas na etapa de saponificação. A quantidade de cera (20 g), temperatura (100°C) e tempo (5 h) foram fixados, e os resultados observados visualmente para o intervalo de tempo decorrido desde a adição da solução de álcali até a interrupção da agitação da massa saponificada, são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Intervalo de tempo decorrido desde a adição da solução de álcali até a interrupção da agitação do sistema, durante a reação de saponificação da da cera bruta.

Nº Teste	[NaOH:água:álcool] (g:mL:mL)	Tempo decorrido desde a adição da solução de NaOH e a observação visual da interrupção da agitação da massa saponificada
1	[2 : 1,5 : 0]	5 minutos
2	[2 : 3,0 : 0]	5 minutos
3	[2 : 6,0 : 0]	10 minutos
4	[2 : 10,0 : 0]	10 minutos
5	[2 : 2,0 : 5]	60 minutos
6	[2 : 2,0 : 10]	Agitação durante toda a reação
7	[2 : 2,0 : 20]	Agitação intensa durante toda a reação

Da Tabela 15, pode-se notar que o problema de agitação da massa saponificada, observado nos ensaios preliminares, foi solucionado com a utilização de soluções alcoólicas em substituição às aquosas. Durante esta etapa, a adição de pequenos volumes de etanol manteve o sistema no estado líquido, garantindo deste modo uma agitação constante durante todo o processo da reação.

SUNDE & RICHEY (1970) patentearam um processo para obtenção de álcoois e ácidos graxos de cera de lanolina, utilizando álcool isopropílico e água como solventes na etapa de saponificação. Segundo os autores, a utilização destes solventes impede a formação de emulsão e permite uma boa separação dos álcoois e ácidos nas etapas subseqüentes. Além disso, o meio mantido em agitação facilitaria a hidrólise dos ésteres e o tempo de reação poderia ser diminuído.

Com base nas referências e nos testes realizados, o etanol foi escolhido como veículo para a reação de saponificação. Nos ensaios subseqüentes, as soluções aquosas extremamente concentradas, utilizadas nos exemplos das patentes, foram substituídas por soluções hidro-alcoólicas de NaOH de diferentes concentrações, mantendo-se as proporções cera : solução de álcali em 1:1.

4.4.2.1.1 – Otimização da reação de saponificação

O estudo da otimização da reação de saponificação foi realizado inicialmente utilizando as técnicas de planejamento experimental. Foram investigadas as condições operacionais para obtenção do melhor rendimento, analisando-se duas variáveis independentes: tempo de processo e concentração da solução de álcali.

A temperatura foi fixada em 80°C, levando-se em consideração os ensaios preliminares. Nestes ensaios, em que as proporções de cera : solução hidro-alcoólica de NaOH foram fixadas em 1 : 1 (p/v) e o banho mantido a 100°C, foi observado que, quando utilizadas soluções de álcali com concentrações inferiores a 4 M, a temperatura

da reação não ultrapassava 80°C (temperatura próxima do ponto de ebulição do etanol). No entanto, se utilizadas soluções mais concentradas, a temperatura da reação aumentava, dependendo da concentração da solução e da temperatura do meio utilizado no aquecimento. Conseqüentemente, para estudar o parâmetro temperatura na otimização do processo, em uma faixa de valores acima de 80°C, os ensaios realizados com soluções diluídas deveriam ser mantidos sob pressão.

Conforme HASS et al. (2000), uma temperatura de saponificação de 100°C é a mais adequada, pois provoca uma reação mais rápida e requer menos álcali. Sendo assim, não houve interesse em estudar temperaturas inferiores a 80°C no processo.

Os níveis das variáveis independentes na etapa de saponificação foram baseados em observações experimentais e também nas propostas das patentes, onde o tempo de reação variou de 3 a 5 horas e a concentração de álcali de 5% a 30% em relação ao peso de cera utilizada no processo.

Devido ao arraste de resina, observado durante a realização dos testes preliminares, os testes de otimização foram realizados com cera purificada.

Para observação dos erros experimentais, os ensaios de extração da mistura de álcoois foram feitos em duplicata, uma vez que o processo envolve várias etapas até obtenção do produto final.

Na Tabela 16 estão representados os valores de rendimento (%) da mistura de álcoois e os teores de álcoois graxos (pureza) (%) dos produtos obtidos no processo de otimização da reação de saponificação da cera purificada.

Tabela 16. Rendimento (%) da mistura de álcoois e teor em álcoois (pureza) (%) obtidos no estudo de otimização da reação de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar (planejamento experimental fatorial completo – 2^2)

Ensaio	Variáveis independentes					
	Nº	Tempo (min)	[NaOH] (M)	Rendimento* (%)	Desvio padrão	Pureza. (%)
1	-1	-1	57,0	4,80	50,2	1,61
2	+1	-1	56,7	0,73	51,2	0,97
3	-1	+1	57,2	3,01	50,8	0,72
4	+1	+1	57,7	2,23	50,1	0,12
5	-1,41	0	55,0	0,74	51,7	1,86
6	+1,41	0	55,2	2,16	49,9	0,62
7	0	-1,41	41,9	3,74	48,4	1,90
8	0	+1,41	54,8	0,50	51,0	1,32
9	0	0	56,7	1,58	48,9	1,13
10	0	0	58,6	0,06	50,9	0,70
11	0	0	55,4	0,65	50,4	0,24

(*) Valores calculados em relação a 10 g de cera purificada

Os resultados mostraram que o rendimento (%), em relação à cera purificada utilizada inicialmente no processo, variou de 54,8% a 58,6%, com exceção do ensaio 7, onde a concentração de NaOH foi mínima (1 M), que apresentou um rendimento de 41,9%.

Na Tabela 17 são apresentadas as estimativas dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento (%) do processo de saponificação e a análise dos dados mostra que somente os termos linear e quadrático da concentração de NaOH foram estatisticamente significativos ($p < 0,10$), refletindo provavelmente a resposta obtida no ensaio 7. Para a variável tempo, dentro da faixa estudada, os termos linear e quadrático não foram estatisticamente significativos, sendo seus desvios padrões muitas vezes maiores que os próprios efeitos.

Tabela 17. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento (%) do processo de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar.

	Efeito	Desvio Padrão	Nível descritivo (p)
Média	56,878	0,9291	0,000267
Tempo (L)	0,121	1,1397	0,925223
Tempo (Q)	0,955	1,3599	0,555179
[NaOH] (L)	4,862	1,1397	0,050801
[NaOH] (Q)	-5,835	1,3599	0,050256
Tempo x [NaOH]	0,400	1,6093	0,826903

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ($P \leq 0,1$)

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):

$$\text{Rendimento (\%)} = 57,33 + 2,43 (\text{concentração de NaOH}) - 3,06 (\text{concentração de NaOH})^2$$

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 18 mostra que a porcentagem de variação explicada pela regressão foi muito baixa, igual a 0,31% e o F calculado foi menor que o tabelado, não havendo um bom ajuste dos valores experimentais ao modelo. Assim, não é adequado tirar o modelo para gerar a superfície de resposta.

Tabela 18. Análise de variância (ANOVA) para o rendimento (%) do processo de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F cal.
Regressão	104,33	3	34,78	2,38
Resíduo	102,26	7	14,61	
Falta de ajuste	97,08	5	19,42	7,49
Erro puro	5,18	2	2,59	
Total	206,59	10		

% variação explicada (R^2) = 0,31 $F_{0,95; 3; 7} = 4,35$ $F_{0,95; 5; 2} = 19,30$

Com relação aos teores de álcoois (pureza) (%) dos produtos obtidos, a análise da Tabela 19 mostra que nenhuma variável foi estatisticamente significativa para esta resposta, dentro das condições estudadas. Nenhum efeito linear, quadrático ou de interação entre as variáveis apresentou significância ($p < 0,10$) e, deste modo, não é possível estabelecer um modelo para o teor de álcoois (%) em função das variáveis tempo e concentração de NaOH estudadas.

Tabela 19. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre o teor de álcoois (pureza) (%) do processo de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar.

	Efeito	Desvio Padrão	Nível descritivo (p)
Média	50,065	0,6009	0,000144
Tempo (L)	-0,561	0,7371	0,525975
Tempo (Q)	0,902	0,8795	0,412969
[NaOH] (L)	0,794	0,7371	0,394119
[NaOH] (Q)	-0,205	0,8795	0,837648
Tempo x [NaOH]	0,850	1,0408	0,499927

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança ($P \leq 0,1$)

L = linear; Q = quadrático

4.4.2.1.2 – Determinação das condições mais favoráveis da etapa de saponificação.

A análise estatística mostrou que, na faixa estudada, não foi possível construir um modelo que representasse o rendimento (%) da mistura de álcoois em função do tempo e da concentração de NaOH. No entanto, foi observado que o ensaio realizado com concentração 1,0 M não apresentou rendimento satisfatório (durante a realização do ensaio 7, o desempenho observado durante a etapa de extração da mistura de álcoois foi diferente do observado nos demais e o produto resultante apresentou característica bastante cerosa) e, para concentrações acima de 2,2 M, independentemente da concentração e tempo utilizados, todos os resultados foram próximos. Assim, um novo modelo deveria ter sido construído, com o tempo variando de 1 a 60 minutos e a concentração de NaOH de 1,0 M a 2,2 M. Porém, a quantidade de amostra disponível

não foi suficiente para a realização de um novo ensaio de otimização e, deste modo, foram realizados somente 4 testes para determinação das condições mais favoráveis para esta etapa.

Testaram-se primeiramente soluções de NaOH com concentrações de 2,0 M e 1,5 M e tempo de 60 minutos.

No ensaio realizado com solução 2,0 N e tempo de 60 minutos o rendimento foi de 56,6% (dentro da faixa de valores apresentados pela maioria dos testes nos ensaios de otimização). No entanto, o ensaio realizado com 1,5 M de NaOH, no mesmo intervalo de tempo, apresentou desempenho similar ao observado no ensaio 7 e o rendimento obtido foi de 39,4%.

Nos ensaios posteriores, a concentração da solução foi mantida fixa em 2,0 M e testados tempos de 30 e 15 minutos e os rendimentos obtidos foram de 55,8% e 56,4% para 30 e 15 minutos, respectivamente.

Após a realização dos ensaios foram definidas as condições: concentração da solução de NaOH de 2,0 M e tempo de 15 minutos como as mais favoráveis tecnicamente para o processo de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar.

4.4.2.2. Etapa de separação da mistura de álcoois graxos da cera purificada saponificada

4.4.2.2.1. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se extração sólido-líquido

Apesar do mau desempenho deste tipo de extração nos ensaios preliminares, os testes foram realizados pois pensava-se inicialmente que utilizando soluções hidroalcoólicas mais diluídas na etapa de saponificação, os álcoois seriam extraídos mais facilmente. A Tabela 20 mostra os rendimentos obtidos em três ensaios de extração sólido-líquido com etanol, utilizando-se quantidades de cera saponificada equivalentes a 10 g de cera purificada.

Tabela 20. Rendimentos (%) das misturas de álcoois, obtidos em 3 ensaios, após 10 horas de extração sólido-líquido, utilizando-se etanol como solvente e quantidades de cera saponificada equivalentes a 10 g de cera purificada.

Ensaio	Rendimento* (%)
1	28,7
2	34,8
3	42,9

(*) valores calculados em relação a 10 g de cera purificada

Nos resultados apresentados na Tabela 20 pode-se observar que mesmo utilizando-se soluções mais diluídas na etapa de saponificação (quando comparadas com as soluções utilizadas nos testes preliminares) e tempos longos de extração, houve grande variabilidade nos resultados. Observaram-se também, após a extração,

variações marcantes nas quantidades de material que ficavam retidas nos cartuchos, indicando provavelmente tempo insuficiente para realização do processo. Além disso, a solução coletada no balão, quando ainda em refluxo, apresentava-se bastante turva, indicando presença de sais extraídos juntamente com os álcoois.

Objetivando obter um produto livre de impurezas, novas extrações foram realizadas, nestes ensaios o material resultante da primeira extração sólido-líquido, após resfriamento e filtração da micela e, antes de ser seco em estufa, foi colocado em outro cartucho e submetido a uma nova extração, por um período de 5 horas. A Tabela 21 mostra os rendimentos das misturas de álcoois obtidos após uma, duas e três extrações sólido-líquido de uma mesma amostra de cera saponificada.

Tabela 21. Rendimentos (%) das misturas de álcoois obtidos com 1, 2 e 3 extrações sólido-líquido de uma mesma amostra de cera saponificada

Número de extrações sólido-líquido	Rendimento* (%)	Desvio padrão
1	35,5	6,04
2	28,7	5,41
3	25,3	5,64

média de 3 repetições

(-) valores calculados em relação a 10 g de cera purificada

Observou-se que a solução obtida após a segunda extração apresentava-se um pouco turva, quando ainda em refluxo, e a resultante de três extrações apresentava-se totalmente transparente. Assim, supôs-se inicialmente que a realização de um maior número de extrações poderia resultar em um produto com maior pureza. Entretanto,

como pouco material ficou retido nos cartuchos, tanto na segunda como na terceira filtração, esta hipótese foi descartada. Além disso, um maior número de extrações poderia implicar em tempo longo para a realização do processo.

O material resultante de uma extração sólido-líquido, após secagem em estufa (60^o/3 h), apresentou coloração amarelo esverdeado escuro e aqueles obtidos com duas e três extrações apresentaram coloração amarelo esverdeado mais claro.

4.4.2.2.2. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se filtração a quente

Como não houve repetibilidade nos rendimentos obtidos nos testes de separação sólido-líquido, um novo processo foi testado. Neste processo, a cera saponificada (equivalente a 10 g de cera purificada) foi dissolvida diretamente em etanol e a mistura resultante foi filtrada a quente para retirada dos sais insolúveis. Na Tabela 22, são mostrados os rendimentos utilizando-se uma, duas e três filtrações sucessivas a quente, antes de submeter a micela ao resfriamento e filtração a frio.

Tabela 22. Rendimentos (%) das misturas de álcoois utilizando-se o processo de filtração a quente.

Número de Filtrações a Quente	Rendimento* (%)	Desvio padrão
1	49,2	0,48
2	42,6	0,38
3	38,5	1,90

média de 2 repetições

(*) valores calculados em relação a 10 g de cera purificada

A solução obtida após a primeira filtração a quente apresentou-se turva e as demais totalmente transparentes. Observou-se também que pouco material ficou retido no filtro após a segunda filtração e na terceira quase nenhum material retido foi observado.

Os rendimentos encontrados para a mistura de álcoois, utilizando-se filtrações a quente (Tabela 22), foram maiores do que os obtidos nos ensaios de extrações sólido-líquido (Tabela 20 e 21) e as amostras obtidas utilizando-se uma, duas e três filtrações apresentaram coloração amarelo esverdeado escuro, não havendo diferença visual de cor entre elas.

A partir dos resultados obtidos e, desconsiderando a cor dos produtos, poderia-se supor que o problema de não repetibilidade da extração sólido-líquido estaria solucionado. Porém, com os equipamentos disponíveis no laboratório foi difícil realizar as filtrações a quente, onde pequenas variações de temperatura causavam a precipitação dos compostos presentes na mistura e obstrução dos poros do filtro. O procedimento era viável com relação a repetibilidade e tempo, mas o equipamento teria que ser redimensionado para ser viável na prática.

4.4.2.2.3. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se solução salina

Procurando-se alternativas, foram testadas novas metodologias para a separação da mistura de álcoois da cera saponificada (equivalente a 10 g de cera purificada). Foram estudados os efeitos de adições sucessivas de solução salina na separação da mistura de álcoois e os resultados obtidos nos processos são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23. Rendimentos (%) das misturas de álcoois e teores de álcoois (pureza) (%) obtidos nos ensaios de extração utilizando-se solução salina

Número de adições de solução salina	Rendimento* (%)	Desvio padrão	Teor de álcoois graxos (pureza) (%)	Desvio padrão
1	93,4	0,28	25,4	0,43
2	88,7	0,60	23,3	0,79
3	85,5	0,89	28,6	1,25

média de 3 repetições

(*) valores calculados em relação a 10 g de cera purificada

Foram realizadas análises em CCD das amostras obtidas e os resultados mostraram que houve concentração dos álcoois presentes, porém, o baixo teor em álcoois (pureza) encontrado, indicou a presença de muitas impurezas.

Concluiu-se também que uma única lavagem com solução salina seria suficiente ou teria o mesmo efeito na extração da mistura de álcoois, pois os teores de álcoois (pureza) (%) obtidos para os produtos resultantes de uma, duas e três extrações com solução salina foram próximos. Além disso, não foi percebida visualmente variação significativa na cor das amostras. A amostra resultante da primeira adição apresentou coloração verde escuro intenso e as demais, coloração verde somente um pouco mais clara.

4.4.2.2.4. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se solução salina e etanol (extração sólido-líquido)

Para retirada dos sais de ácidos graxos (sabões) remanescentes, o material resultante da etapa de separação com solução salina foi submetido a uma e duas extrações sólido-líquido e os resultados são mostrados na Tabela 24.

Tabela 24. Rendimentos (%) e teores de álcoois (pureza) (%) dos produtos obtidos utilizando-se 1 e 2 extrações sólido-líquido do material resultante da etapa com solução salina.

Número de extrações sólido-líquido	Rendimento* (%)	Desvio padrão	Teor de álcoois graxos (pureza) (%)	Desvio padrão
1	52,6	1,33	49,7	1,54
2	46,1	0,75	47,4	0,58

média de 3 repetições

(-) valores calculados em relação a 10 g de cera purificada

A solução obtida após a primeira extração apresentou-se um pouco turva e com traços de resina e pouco material foi observado nos cartuchos. Já na segunda extração, a solução apresentou-se totalmente transparente, sem traços de resina e pouquíssimo material foi observado nos cartuchos.

Como os rendimentos e teores em álcoois dos produtos obtidos foram próximos, concluiu-se que uma única extração sólido-líquido seria suficiente.

O material obtido após uma lavagem com solução salina e uma extração sólido-líquido apresentou cor verde amarelado claro e a coloração da amostra submetida a duas extrações sólido-líquido foi somente um pouco mais clara.

4.4.2.2.5. Testes de separação da mistura de álcoois graxos utilizando-se solução salina e etanol

Procurando-se alternativas para a etapa da extração sólido-líquido, com redução do tempo de processo, foram realizados alguns testes nos quais o material obtido na etapa de solução salina foi dissolvido diretamente em etanol. A Tabela 25 mostra o rendimento (%) médio e o teor de álcoois (pureza) obtidos nos ensaios realizados.

Tabela 25. Rendimento médio (%) e teor de álcoois (pureza) (%) obtidos nos ensaios de separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina e etanol.

Rendimento * (%)	Desvio padrão	Teor de álcoois graxos pureza (%)	Desvio padrão
55,4	0,49	49,8	0,23

média de 3 repetições

(*) valores calculados em relação a 10 g de cera purificada

O rendimento médio (%) e o teor de álcoois (pureza) obtidos no processo de separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina e etanol foram próximos daqueles observados quando a mistura foi submetida a uma extração sólido-líquido e o produto resultante apresentou coloração amarelo claro e aspecto uniforme.

Nos ensaios de separação da mistura de álcoois utilizando-se solução salina e etanol formou-se um precipitado (após adição de etanol e aquecimento), de aspecto resinoso e coloração muito escura, que foi separado antes que a solução fosse submetida ao resfriamento e filtração a frio. Assim, pode-se supor que a separação deste material tenha contribuído para a obtenção de um produto final com coloração mais clara e aspecto mais uniforme.

4.4.3. Processo definido para obtenção do “policosanol 50”

Considerando o tempo e a facilidade na execução de cada ensaio estudado, foi definida a metodologia composta das etapas descritas em 3.3.4.2.1.2. (saponificação nas condições mais favoráveis) e 3.3.4.2.2.5 (separação da mistura de álcoois utilizando solução salina e etanol) como sendo a mais adequada para obtenção da mistura de álcoois denominada “policosanol 50”.

O produto obtido segundo a metodologia definida, apresentou coloração amarelo claro, rendimento de 55 - 60% em relação à cera purificada (utilizada inicialmente na etapa de saponificação) e teor de álcoois de 45-55%.

Na Tabela 26 são apresentadas a composição em álcoois do “policosanol 50”

Tabela 26. Composição em álcoois graxos do “policosanol 50”, obtido após saponificação da cera purificada (nas condições mais favoráveis) e separação da mistura de álcoois utilizando solução salina e etanol

Álcoois Graxos	% relativa	
	“Policosanol 50”	Desvio padrão
24 : 0	3,1	0,15
26 : 0	19,7	1,33
27 : 0	1,2	0,04
28 : 0	63,6	2,07
29 : 0	0,2	0,03
30 : 0	9,4	1,12
32 : 0	2,8	0,10
34 : 0	-	-

média de 3 repetições

Na Figura 9, mostra-se o cromatograma com o perfil dos álcoois graxos do produto obtido, denominado “policosanol 50”.

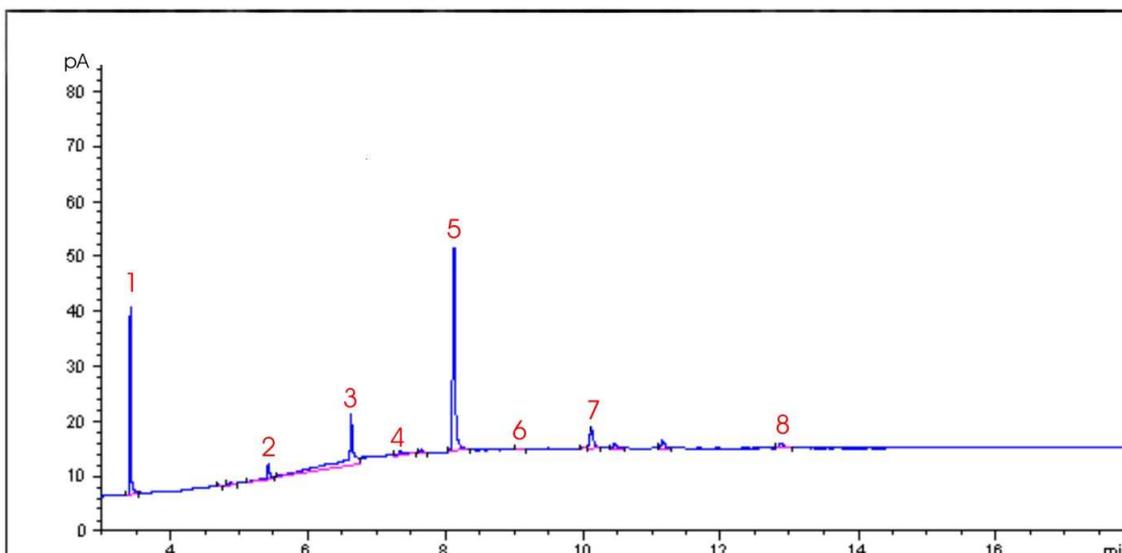


Figura 9. Cromatograma dos álcoois graxos totais do “policosanol 50”

1: Padrão primário eicosanol (C20:0-OH); 2: tetracosanol (C24:0-OH);
3: hexacosanol (C26:0-OH); 4: heptacosanol (C27:0-OH); 5: octacosanol
(C28:0-OH); 6: nonacosanol (C29:0-OH); 7: triacontanol (C30:0-OH);
8: dotriacontanol (C32:0-OH).

4.4.4. Purificação do “policosanol 50” para obtenção do “policosanol 90”

O material obtido conforme 3.3.4.3. e denominado “policosanol 50” foi purificado com acetona e o material resultante apresentou cor branca, rendimento de 25,7% em relação à cera purificada (utilizada inicialmente na etapa de saponificação) e teor de álcoois de 92,3%.

Na Tabela 27, são apresentadas a composição em álcoois graxos do “policosanol 90”, a composição do Lestanol utilizado como padrão e a especificação do Lestanol fornecida pelo fabricante.

Tabela 27. Composição em álcoois graxos do “policosanol 90”, obtido após purificação com acetona, e a composição e especificação do Lestanol utilizado como padrão

Álcool Graxo	% relativa				
	Policosanol	Desvio padrão	Lestanol	Desvio padrão	Especificação Lestanol
24 : 0	2,6	0,45	3,5	0,18	1 – 10%
26 : 0	14,2	1,71	9,6	0,17	2 – 15%
27 : 0	1,4	0,14	0,4	0,01	0 – 0,5%
28 : 0	67,4	1,63	67,9	1,41	55 – 70%
29 : 0	0,5	0,01	0,4	0,01	0 – 10%
30 : 0	10,7	0,39	13,4	0,33	5 – 20%
32 : 0	3,2	0,01	3,7	0,04	0,1 – 10%
34 : 0	-	-	1,1	0,09	0,1 – 10%

média de 3 repetições

Os resultados observados mostram que o produto obtido se assemelha ao padrão na composição dos principais álcoois graxos presentes.

Nas Figuras 10 e 11, apresentam-se os cromatogramas com o perfil dos álcoois graxos do produto obtido denominado “policosanol 90” e do Lestanol utilizado como padrão.

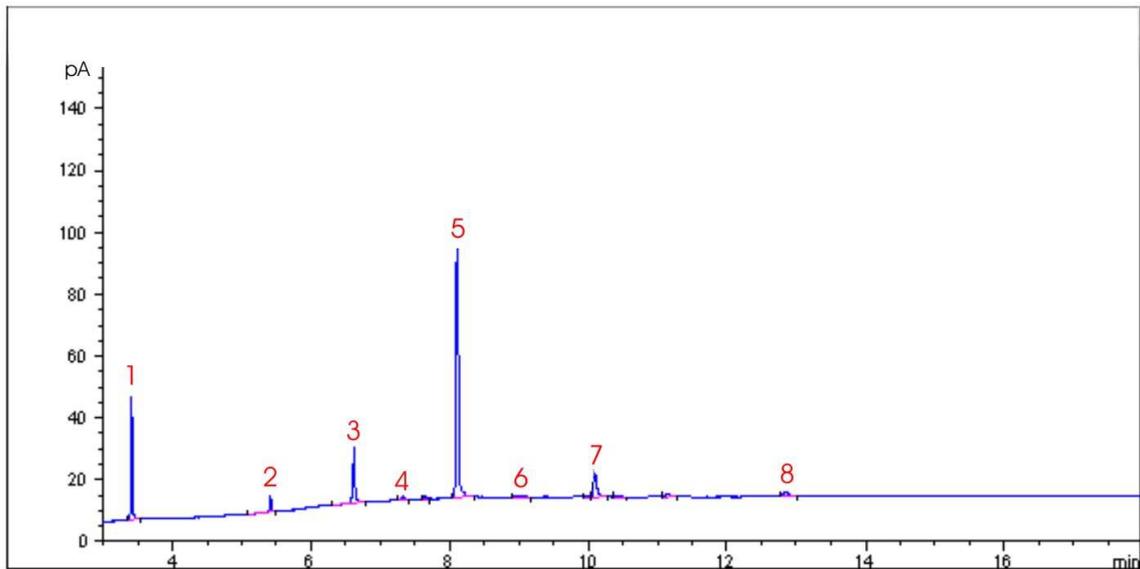


Figura 10. Cromatograma em álcoois do “Policosanol 90”

1: Padrão primário eicosanol (C20:0-OH); 2: tetracosanol (C24:0-OH);
3: hexacosanol (C26:0-OH); 4: heptacosanol (C27:0-OH);
5: octacosanol (C28:0-OH); 6: nonacosanol (C29:0-OH);
7: triacontanol (C30:0-OH); 8: dotriacontanol (C32:0-OH).

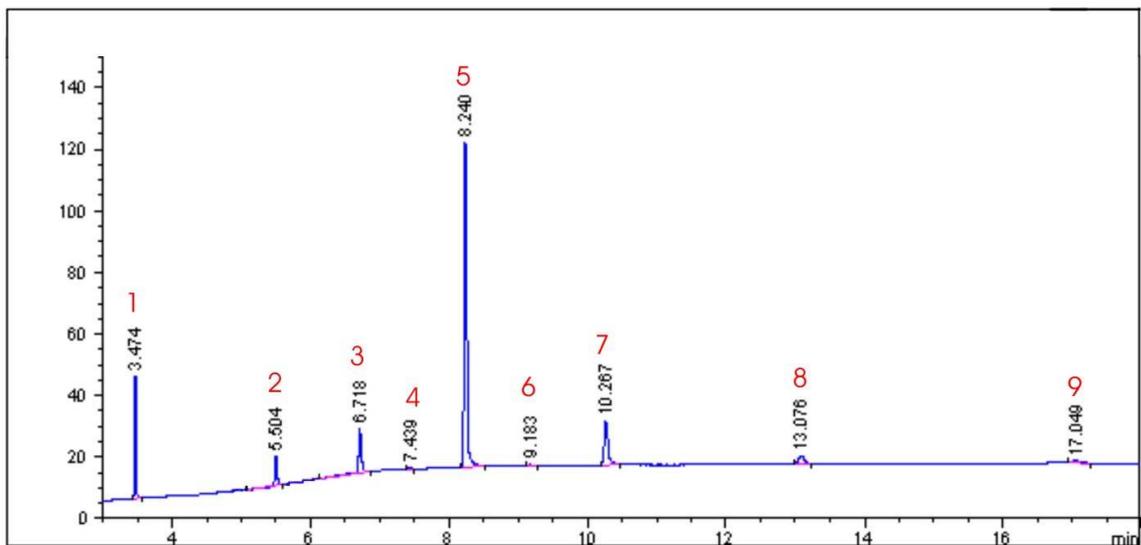


Figura 11. Cromatograma em álcoois do Lestanol utilizado como padrão

- 1: Padrão primário eicosanol (C20:0-OH); 2: tetracosanol (C24:0-OH);
 3: hexacosanol (C26:0-OH); 4: heptacosanol (C27:0-OH);
 5: octacosanol (C28:0-OH); 6: nonacosanol (C29:0-OH);
 7: triacontanol (C30:0-OH); 8: dotriacontanol (C32:0-OH).

Os resultados obtidos para o “policosanol 90” (rendimento igual a 25,7% e teor de álcoois de 92,3%), foram próximos dos valores encontrados na maioria dos exemplos citados nas patentes (LAGUNA GRANJA et al., 1997; 1999) usadas como referência básica neste estudo. Nos exemplos mencionados, os autores utilizaram cera bruta ou purificada para extração da mistura de álcoois. A reação de saponificação foi realizada em um período de 3 a 8 horas e a mistura de álcoois foi separada utilizando-se extração sólido-líquido com solventes diversos, por períodos maiores que 10 horas, sendo em seguida purificada. Os rendimentos variaram de 13% a 27,4% e a pureza de 92,72% a 94,34%.

O ponto de fusão de 80,0°C encontrado para o “policosanol 90” foi próximo dos valores reportados nos exemplos das patentes (80-82°C) e similar ao valor encontrado para o Lestanol de 80,4°C.

5. CONCLUSÕES

O processo de obtenção da mistura de álcoois (policosanol) a partir de cera de cana-de-açúcar, envolvendo as etapas de saponificação da cera purificada e posterior separação dos álcoois utilizando-se solução salina e etanol e solução salina, etanol e acetona mostrou ser tecnicamente viável para a obtenção de produtos com concentração de álcoois de 50% e 90%, respectivamente.

As condições definidas para a reação de saponificação da cera purificada de cana-de-açúcar, fixando-se o parâmetro cera:solução alcoólica de NaOH em 1:1 (p/v) foram: concentração da solução de NaOH de 2 M, temperatura de 80°C e tempo de 15 minutos.

A separação da mistura de álcoois da cera purificada e saponificada com solução salina e etanol permitiu obter um produto com concentração de 50% de álcoois (“policosanol 50”).

A purificação do “policosanol 50” através de extração com acetona permitiu obter um produto com 92,3% de álcoois livres.

Considerando o teor de álcoois graxos totais presentes na cera purificada de cana de açúcar, a recuperação dos álcoois obtida no processo de obtenção do “policosanol 90” foi de 85,6%.

Comparando as composições em álcoois graxos do “policosanol 90” com a do produto comercial Lestanol (GARUDA INTERNATIONAL INC.), conclui-se que o processo empregado permitiu a obtenção de um produto similar.

O rendimento e a pureza do produto denominado “policosanol 90”, obtido neste estudo, foram próximos de alguns dos exemplos reportados na literatura, porém, com redução significativa nos tempos de processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. E. U.; HILDITCH, T. P. The acidic components of wool grease. **Journal of the Society of Chemical Industry**, p.398– 404, 29/11/1935.

ADAMENAS, J. O negócio é fazer cera. **Química e Derivados**, p.24-29, agosto, 1982.

ALEMAN, C.L.; MÁ S, R.; HERNÁNDEZ, C. A 12 months study of policosanol oral toxicity in Sprague-Dawley rats. **Toxicology Letters**, v.70, n.1, p.77-87, 1994.

ALEMAN, C. L.; MÁ S, R.; NOA, P. M.; RODEIRO, G. I.; HERNÁNDEZ, O. C.; CAPOTE, A. Carcinogenicity of policosanol in Sprague Dawley rats: a 24month study. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.18, n.4, p.1-7, 1998.

ANEIROS, E.; MÁ S, R.; CALDERÓN, B.; ILLNAIT, J.; FERNÁNDES, L.; CASTAÑO, G.; FERNÁNDEZ, J. C. Effect of policosanol in lowering cholesterol levels in patients with type II hypercholesterolemia. **Current Therapeutic Research**, v.56, n.7, p.296-304, 1995.

AOCS – AMERICAM OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices**. 4^a ed., Champain: AOCS Press, 1996.

ARRUZAZABALA, M. L.; MOLINA, V.; CARBAJAL, D.; VALDÉS, S.; MÁ S, R. Effect of policosanol on cerebral ischemia in mongolian gerbils: Role of prostacyclin and thromboxane A2. **Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids**, v.49, n.3, p.695-697, 1993.

ARRUZAZABALA, M. L.; CARBAJAL, D.; MÁ S, R.; MOLINA, V.; VALDÉS, S.; LAGUNA, A. Cholesterol lowering effects of policosanol in rabbits. **Biological Research**, v.27, n.3-4, p.205-208, 1994.

ARRUZAZABALA, M. L.; VALDÉS, S.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, L.; CARBAJAL, D. Effect of policosanol successive dose increases on platelet aggregation in healthy volunteers. **Pharmacological Research**, v.34, n.5-6, p.181-185, 1996.

ARRUZAZABALA, M. L.; VALDÉS, S.; MÁS, R.; CARBAJAL, D.; FERNÁNDEZ, L. Comparative study of policosanol, aspirin and the combination therapy policosanol-aspirin on platelet aggregation in healthy volunteers. **Pharmacological Research**, v.36, n.4, p.293-297, 1997.

ARRUZAZABALA, M. L.; MÁS, R.; MOLINA, V.; CARBAJAL, D.; MENDOZA, S.; FERNÁNDEZ, L.; VALDÉS, S. Effect of policosanol on platelet aggregation in type II hypercholesterolemic patients **International Journal of Tissue Reactions – Experimental and Clinical Aspects**, v.20, n.4, p.119-124, 1998.

ARRUZAZABALA, M.L.; MOLINA, V.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, L.; CARBAJAL, D.; VÁLDEZ, S.; CASTAÑO, G. Antiplatelet effects of policosanol (20 and 49 mg/day) in healthy volunteers and dyslipidaemic patients. **Blackwell Science Ltd.**, v.29, n.10, p.891-897, 2002.

AZZAM, A. M. Further investigations on cane wax refining and bleaching. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.88, n.5, p.191-194, 1986.

BALCH, R. T. The lipids of sugarcane. In: HONIG, P. **Principles de Sugar Technology**. New York: Elsevier Publishing Company, v.1, cap.7, p.196-213, 1953.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2 ed., Editora da Unicamp, Campinas, 1996, 299 p.

BAYMA, C. **Tecnologia do Açúcar**. Vol I, 1^a ed., Companhia Editora Americana, Rio, 1974, 292p.

BRAVO, L. G.; HERNÁNDEZ, J. M.; GONZALEZ, P. C. A.; SOUTO, N. P. Analytical procedure for the determination of 1-octacosanol in plasma by solvent extraction and capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography B**, n.682, p.359-363, 1996.

BENÍTEZ, M.; ROMERO, C.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, J. C. A comparative study of policosanol versus pravastatin in patients with type II hypercholesterolemia. **Current Therapeutic Research**, v.58, n.11, p.859-867, 1997.

BENNET, H. **Industrial Waxes**. Vol I e II, 1^a ed. , New York: Chemical Publishing Company, p.289 e 324, 1963.

BERKOV, R. **El Manual Merck**. 6 ed., Rahway. Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, 1978, 729 p.

CANAVACCIOLO, V. L. G.; HERNÁNDEZ, J. M. Validation of a gas chromatographic method for determination fatty alcohols that compose policosanol in five-miligram film-coated tablets. **Journal of AOAC International**, v.82, n.4, p.834-839, 1999.

CARBAJAL, D.; ARRUZAZABALA, M. L.; MÁS, R.; MOLINA, V.; VALDÉS, S. Effects of policosanol on experimental thrombosis models. **Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids**, v.50, n.5, p.249-251, 1994.

CARBAJAL, D.; ARRUZAZABALA, M. L.; MÁS, R. Effect of policosanol on platelet aggregation and serum levels of arachidonic acid metabolites in healthy volunteers. **Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids**, v.58, n.1, p.61-64, 1998.

CARBAJAL, D.; ARRUZAZABALA, M. L.; MÁS, R. Interaction policosanol-warfarin on bleeding time and thrombosis in rats. **Pharmacological Research**, v.38, n.2, p.89-91, 1998.

CARR, K. Cuban biotechnology treads a lonely path. **Nature**, vol 398, supp, p.22-23, 1999.

CARVALHO, L. C. C. Cana pede demanda. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.16, n.3, p.6-7, 1998.

CASTAÑO, G.; MÁS, R.; NODARSE, M.; ILLNAIT, J.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, J. C. One-year study of the efficacy and safety of policosanol (5 mg twice daily) in the treatment of type II hypercholesterolemia. **Current Therapeutic Research**, v.56, n.3, p.296-304, 1995.

CASTAÑO, G.; NODARSE, M.; MÁS R. Comparaciones de los efectos del policosanol y la lovastatina en pacientes con hipercolesterolemia primaria tipo II. **Revista CENIC de Ciencias Biologicas**, v.27, p.57-63, 1996.

CASTAÑO, G.; TULA, L.; CANETT, M.; MORERA, M.; MÁS, R.; ILLNAIT, J.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, J. C. Effects of policosanol in hypertensive patients with type II hypercholesterolemia. **Current Therapeutic Research**, v.57, n.9, p.691-699, 1996.

CASTAÑO, G.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, J. C.; ILLNAIT, J.; FERNÁNDEZ, L.; ALVAREZ, E. Effects of policosanol in older patients with type II hypercholesterolemia and high coronary risk. **Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical**, v.56, n.3, p.186-192(M), 2001.

CASTAÑO, G.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, L.; ILLNAIT, J.; HERNÁNDEZ, E.; FERNÁNDEZ, J. C.; GÁMEZ, R.; GUTIÉRREZ, C.; ALVAREZ, E. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy and tolerability of policosanol in adolescents with type II hypercholesterolemia. **Current Therapeutic Research**, v.63, n.4, p.286-303, 2002.

CASTAÑO, G.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, L.; ILLNAIT, J.; MESA, M.; ALVAREZ, E.; LEZCAY, M. Comparison of the efficacy and tolerability of policosanol with atorvastatin in elderly patients with type II hypercholesterolemia. **Adis International**, v.20, n.2, p.153-163, 2003.

CHRISTIE, W. W. **Waxes: Structure, Composition, Occurrence and Analysis**. Dundee: Scottish Crop Research Institute, 2003. Disponível na internet: www.lipid.co.uk

CRESPO, N.; ALVAREZ, R.; MÁS, R.; ILLNAIT, J.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, J. C. Effects of policosanol on patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypercholesterolemia: a pilot study. **Current Therapeutic Research**, v.58, n.1, p.44-51, 1997.

CRESPO, N.; ILLNAIT, J.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, J.; CASTAÑO, G. Comparative study of the efficacy and tolerability of policosanol and lovastatin in patients with hypercholesterolemia and noninsulin dependent diabetes mellitus. **International Journal Clinical Pharmacologic Research**, v.4, n.19, p.117-127, 1999.

CRUZ, B. D.; MEDEROS, C. M.; MÁS, R. Efecto hipocolesterolémico del Ateromixol (PPG) en el cerdo en ceba. **Revista CENIC de Ciencias Biológicas**, v.22, p.62-63, 1991.

GARCIA, A.; TÍO, M. V.; ALVAREZ, M. Cera de cachaza. In: **Desarrollo y perspectivas. Subproductos y derivados de la agroindustria azucarera**. Colección GEPLACEA – Serie Diversificación, p. 315-325, 1988.

GARCIA, A.; RODRÍGUEZ, G. B.; TÍO, M. V. Cera refinada de torta. **Manual dos Derivados da Cana de Açúcar**, ICIDCA, Cap.5.5, p.399-404, 1999.

GARCIA, A.; GARCIA, M. A.; RIBAS, M.; BROWN, A. Recuperación de cera de cutícula de cana de azúcar mediante separación mecánica y extracción con solventes. **Grasas e Aceites**, v.54, fasc.2, p.169-174, 2003.

GOUNI-BERTHOLD, I.; BERTHOLD, H. K. Policosanol: Clinical pharmacology and therapeutic significance of a new lipid lowering agent. **American Heart Journal**, v.143, n.2, p.356-365, 2002.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. **The Lipid Handbook**. 1 ed., Chapman and Hall, New York, 1986, 571 p.

HASS, M. J.; BLOOMER, S.; SCOTT, K. Simple, high-efficiency synthesis fatty acid methyl esters from soapstock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.77, n.4, p.373-379, 2000.

HATT, H. H.; STRASSER, P. H. A.; TROYAHN, W. J. Refining and Bleaching of Sugar Cane Wax. **U. S. Patent 2.640.841**, 02/06/1953.

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

HERNANDEZ, F.; ILLNAIT, J.; MÁS, R.; CASTAÑO, G.; FERNÁNDEZ, L.; GONZÁLEZ, M.; CORDOVI, N.; FERNÁNDEZ, J. C. Effect of policosanol on serum lipids and lipoproteins in healthy volunteers. **Current Therapeutic Research**, v.51, p.568-575, 1995.

HORNER, J. L.; TRUTER, E. V. Emulsion Reactions: the Hydrolysis of Wool Wax. **Nature**. v.165, n.4202, p.771, 1950.

ILLNAIT, J.; CASTAÑO, G.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, J. C. A comparative study on the efficacy and tolerability of policosanol and simvastatin for treating type II hypercholesterolemia. Abstract front the 4th International Confereicc on Preventive Cardiology. June 29-July 3. **Canadian Journal of Cardiology**, 13:Suppl. B, 342B., 1997.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005. Disponível na internet: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>

KABIR, Y.; KIMURA, S. Biodistribution and metabolism of orally administered octacosanol in rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.37, p.33-38, 1993.

KAWANISHI, K.; AOKI, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUNOBU. A. Free primary alcohols 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.

KRANZ, Z. H.; LAMBERTON, J. A.; MURRAY, K. E.; REDCLIFFE, A. H. An examination of the constituents of. Sugar-cane cuticle wax by gas chromatography. **Australian Journal of Chemistry**, v.13, p.498-505, 1960.

KRELL, R. Value added products from beekeeping. Fao Agricultural Services Bulletin, n. 124, 1996. Disponível na internet: www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e13.htm.

LAGUNA GRANJA, A.; HERNÁNDEZ, M.; QUINTANA, D. C.; VALMANA, L. A.; FERREIRO, R. M.; MESA, M. G. Mixture of higher primary aliphatic alcohols, its obtention from sugar cane wax and its pharmaceutical uses. **U. S. Patent 5.663.156**, 02/09/1997.

LAGUNA GRANJA, A.; HERNÁNDEZ, M.; QUINTANA, D. C.; VALMANA, L. A.; FERREIRO, R. M.; MESA, M. G. Mixture of higher primary aliphatic alcohols, its obtention from sugar cane wax and its pharmaceutical uses. **U. S. Patent 5.856.316**, 1999.

LAMBERTON, J. A.; REDCLIFFE, A. H. The chemistry of sugar-cane wax. **Australian Journal Chemistry**, v.13, p.261-268, 1959.

LEME JÚNIOR, J. & BORGES, J. M. **Açúcar de cana**. Imprensa Universitária, Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, Viçosa, 1965, 325 p.

LEVY, R. I. Medicamentos Empregados no Tratamento das Hiperlipoproteinemias em **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 6 ed., Guanabara Koogan, cap.34, p.729-741, 1996.

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, p.89-114.

MAFRA, P. H. **Sulfitação do caldo de cana-de-açúcar e aspectos ambientais decorrentes**. 2004. Tese (Mestrado) – Escola de Engenharia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

MARCELLO, S.; GLADSTEIN, J.; TESONE, P.; MÁZ, R. Effects of bezafibrate plus policosanol or placebo in patients with combined dyslipidemia: a pilot study. **Current Therapeutic Research**, v.61, n.6, p.346-357, 2000.

MARQUES, M. P. **Preparação e reatividade dos Álcoois**. Trabalhos Práticos, Tecnologia Bioquímica I, Departamento de Bioquímica, FCTUC, 2004. Disponível na internet: <http://www.uc.pt/bioquimica/discipli/seb05.pdf>

MARTUCCI, E. T. **Tecnologia do açúcar de cana**. Fundação de Pesquisas e Tecnologia, 1983, 243 p.

MÁS, R.; CASTAÑO, G.; ILLNAIT, J.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, J.; ALEMAN, C.; PONTIGAS, V.; LESCOAV, M. Effects of policosanol in patients with type II hypercholesterolemia and additional coronary risk factors. **Clinical Pharmacological Therapeutic**, v.65, n.4, p.439-447, 1999.

MÁS, R.; RIVAS, P.; IZQUIERDO, J. E.; HERNÁNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, J.; ORTA, S. D.; ILLNAIT, J.; RICARDO. Y. Pharmacoeconomic study of policosanol. **Current Therapeutic Research**, v.60, p.458-467, 1999.

MCCLOUD, E. S. Sugar Cane Refining. **U. S. Patent 2.456.641**. 21/12/1948

MEADE, G. P. **Cane Sugar Handbook**. 9^o ed., John Wiley & Sons, New Orleans, 1967, 845 p.

MENÉNDEZ, R.; AMOR, A. M.; GONZALEZ, R. M. Effect of policosanol on the hepatic cholesterol biosynthesis of normocholesterolemic rats. **Biological Research**, v.29, n.2, p.253-257, 1996.

MENÉNDEZ, R.; SOTOLONGO, V.; FRAGA, V. Plasma levels and excretion of total radioactivity in healthy volunteers after oral administration of 3-H octacosanol. **Revista CENIC de Ciencias Biológicas**, v.27, p.32-35, 1996.

MENÉNDEZ, R.; ARRUZAZABALA, L.; MÁS, R. Cholesterol lowering effect of policosanol on rabbits with hypercholesterolemia induced by a wheat starch-casein diet. **British Journal of Nutrition**, v.77, p.923-932, 1997.

MENÉNDEZ, R.; MÁS, R.; AMOR, A. M.; GONZALEZ, R. M.; FERNÁNDEZ, J. C.; RODEIRO, I.; ZAVAS, M.; JIMÉNEZ, S. Effects of policosanol treatment on the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) isolated from healthy volunteers to oxidative modification in vitro. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.50, n.3, p.255-263, 2000.

MENÉNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, S. L.; DEL RIO, A. Policosanol modulates HMG-CoA reductase activity in cultured fibroblasts. **Archives of Medical Research**, v.32, n.1, p.8-12, 2001.

MESA, A. R.; MÁS, R.; NOA, M. Toxicity of policosanol in Beagle dogs: one year study. **Toxicology Letters**, v.73, n.2, p.131-139, 1994.

MOLINA, V.; ARRUZAZABALA, M. L.; CARBAJAL, D.; VALDÉS, S.; NOA, M.; MÁS, R.; FRAGA, V.; MENÉNDEZ, R. Effect of policosanol on cerebral ischemia in Mongolian gerbils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.10, p.1269-1276, 1999.

MOLINA, V.; ARRUZAZABALA, M. L.; CARBAJAL, D.; MÁS, R. Synergistic effect of D-003 and aspirin on experimental thrombosis model. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.68, n.15, p.305-310, 2003.

MUNOZ, D. H. **Las Ceras – Introducción y aplicaciones; Ceras Naturales, vegetales y animales; Ceras como aditivos en productos alimenticios**. Disponible na internet <http://www.iberceras.com/paginas/documentacion.htm>

NOA, M.; FERRERA, M.; MAGRANER, J.; MÁS, R. Effect of policosanol on isoprenaline-induced myocardial necrosis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, n.4, p.282-285, 1994.

NOA, M.; MÁS, R.; MAGRANER, J. Effect of policosanol on lipofundin-induced atherosclerotic lesions in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.47, n.4, p.289-291, 1994.

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.

OHNISHI, M.; OBATA, S.; ITO, S.; FUJINO, Y. Composition and molecular species of waxy lipids in wheat grain. **Cereal Chemistry**, v.63, n.3, p.193-196, 1986.

ORTENSI, G.; GLADSTEIN, J.; VALLI, H.; TESONE, P. A. A comparative study of policosanol versus simvastatin in elderly patients with hypercholesterolemia. **Current Therapeutic Research**, v.58, n.6, p.390-401, 1997.

PATURAU, J. M. **By-products of the Cane Sugar Industry**. New York: Elsevier Publishing Company, 1969, 274 p.

PHUKAN, A. C. Process for the preparation of refined hard sugarcane wax having improved qualities from press mud. **U.S. Patent 6.486.335**, 26/11/2002.

PHUKAN, A. C.; BORUAH, R. K. Extraction and evaluation of microcrystalline wax from press mud waste of sugar industry. **Separation and Purification Technology**, v.17, p.189-194, 1999. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/seppur>.

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.

PONS, P.; JIMÉNEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; ILLNAIT, J.; MÁS, R.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, J. C. Effects of policosanol in elderly hypercholesterolemic patients. **Current Therapeutic Research**, v.53, p.265-269, 1993.

PONS, P.; ILLNAIT, J. ; MÁS, R. A comparative study of policosanol versus probucol in patients with hypercholesterolemia. **Current Therapeutic Research**, v.58, n.1, p.26-35, 1997.

RIZZO, W. B.; CRAFT, D. A.; DAMMANN, A. L. Fatty alcohol metabolism in cultured human fibroblasts: evidence for a fatty alcohol cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.36, p.17412-17419, 1987.

RODRIGUEZ, M. D.; SANCHEZ, M.; GARCIA, H. Multigeneration reproduction study of policosanol in rats. **Toxicology Letters**. v.90, n.2-3, p.97-106, 1997.

RODRIGUEZ, M. D.; GARCIA, H. Evaluation of peri- and post-natal toxicity of policosanol in rats. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.18, n.1, p.1-7, 1998.

SERRA, G. E.; STUPIELLO, J. P.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Folheto: **Atualização tecnológica na indústria sucro-alcooleira**. Auditório Hélio Morgati, Piracicaba, 26 e 27/03/1997.

SEXTON, W. A.; WARD, D. Treatment of Waxes. **U.S. Patent 2.021.926**. 26/11/1935.

SIERRA, R.; GONZALEZ, V. L.; MAGRANER, J. Validation of a gas chromatographic method for determination of fatty alcohols in 10 mg film-coated tablets of policosanol. **Journal of AOAC International**, v.85, n.3, p.563-566, 2002.

SHO, H. Vitamin Retailer (1972). Disponível Internet. www.vitaminretailer.com/VR/articles/policosanol.htm.

SUNDE, C. J.; RICHEV JR, T. B. Process for producing wool wax alcohols and fatty acids. **U.S. Patent 3,526,647**. 01/09/1970.

TAYLOR, A. K. From raw sugar to raw materials. **Chemical Innovations**, November 45-48, 2000.

TORRES, O. ; AGRAMONTE, A. J. ; ILLNAIT, J. Treatment of hypercholesterolemia in NIDDM with policosanol. **Diabetes Care**, v.18, n.3, p.393-397, 1995.

TRUTER, E. V. **Wool Wax: Chemistry and Technology**. London: Cleaver-Hume, 1950, 368 p.

URIBARRI, E.; LAGUNA, A.; SIERRA, R.; RICARDO, Y. Physico-mechanical characterization of policosanol, a novel hypocholesterolemic drug. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.28, n.1, p.89-93, 2002.

VALDÉS, S.; ARRUZAZABALA, M. L.; CARBAJAL, D.; FERNÁNDEZ, L. Effect of policosanol on platelet aggregation in healthy volunteers. **International Journal of Clinical Pharmacologic Research**, v.16, n.2-3, p.67-72, 1996.

VIEIRA, T. M. F. S. **Obtenção de cera de cana-de-açúcar a partir de subproduto da indústria sucro-alcooleira: extração, purificação e caracterização**. 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

WARTH, A. H. **The Chemistry and Technology of Waxes**. New York: Reinold Publishing Corporation, 1947, 519p.

WELLER, C. L.; GENNADIOS, E.; SARAIVA, R. A. Edible bilayer films from zein and grain sorghun wax or carnauba wax. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.31, n.3, p.279-285, 1998.

ZORDOYA, R.; TULA, L.; CASTAÑO, G.; MÁS, R. (1996): Effects of policosanol on hypercholesterolemic patients with disturbances on serum biochemical indicators of hepatic function. **Current Therapeutic Research**, v.57, n.7, p.568-577, 1996.