



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



**Processo simplificado para a produção de concentrado
de ácidos graxos de cadeia longa (D-003) a partir da cera
de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**

Julice Dutra Lopes
Engenheira de Alimentos

Profº. Dr. Daniel Barrera -Arellano
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L881p	Lopes, Julice Dutra Processo simplificado para a produção de concentrado de ácidos graxos de cadeia longa (D-003) a partir da cera de cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.) / Julice Dutra Lopes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Daniel Barrera-Arellano Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1. <i>Saccharum officinarum</i> L. 2. Cera de cana-de-açúcar. 3. Ácidos graxos. 4. Torta de filtro. I. Barrera-Arellano, Daniel. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título. (lpm/fea)
-------	--

Título em inglês: Simplified process to production of concentrated long chain fatty acids from sugar cane wax (*Saccharum officinarum* L.)

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Saccharum officinarum* L., Sugar cane wax, Fatty acids, Filter cake

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Daniel Barrera-Arellano

Nara Lúcia Facioli

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Renato Grimaldi

Francisco Carlos Deschamps

Data de defesa: 25 de fevereiro de 2010

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

JULICE DUTRA LOPES

Processo simplificado para a produção de concentrado de ácidos graxos de cadeia longa (D-003) a partir da cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Data de aprovação: 25/02/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano (Orientador)

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Nara Lúcia Facioli (Membro)

Centro Universitário de Franca – Uni-FACEF

Prof^a. Dr^a. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves (Membro)

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Dr. Renato Grimaldi (Suplente)

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Prof. Dr. Francisco Carlos Deschamps (Suplente)

Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI

*Dedico este trabalho a **Deus**, senhor da minha vida.*

À minha família, pelo apoio durante esta pesquisa.

.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem dedico todas as minhas conquistas e alegrias. Pelo seu amor incondicional, e por me dar forças para sempre recomeçar.

À minha querida mãe Lucinha, pela dedicação de anos para comigo e meus irmãos. Tudo que somos, devemos a ti querida mãe.

Ao meu pai Pedro, pelo carinho e amor.

Aos meus irmãos Clauberto e Fabiana, que me apoiaram em todas as grandes decisões de minha vida.

Ao Mirko, pelo apoio, carinho e atenção nas horas difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano, pela oportunidade e confiança.

Aos professores membros da banca examinadora, Prof^a. Nara Facioli, Prof^a Lireny Gonçalves, Dr. Renato Grimaldi e Prof. Francisco Deschamps pelas valiosas sugestões e correções apresentadas.

À Rosana Nogueira pela amizade e disposição de ajudar.

Ao Chiu Ming e Rodrigo Basso, pela ajuda, disponibilidade e acima de tudo pela amizade!

Às amigas Kelly Gandra, Rita Garcia, Raquel Silveira e Marilene Morselli, pela presença e companheirismo nos momentos bons e ruins desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Nelson Antoniosi da Universidade Federal de Goiás, e toda sua equipe, pela ajuda e disposição nas análises.

Ao Dr. Rodolfo Rohr, dono da Empresa Consultec, pela oportunidade concedida para realização de parte dos experimentos desta pesquisa.

Ao Gustavo Forlin, pela amizade, apoio e informações essenciais para a realização desta pesquisa.

À Joeni Wada e Andrea Paixão pela ajuda e paciência em responder minhas dúvidas.

A todos os amigos do Laboratório de Óleos e Gorduras, em especial Luciene, Paulinha, Cibele, Andréia, Monise e Oscar, pela amizade e bons momentos compartilhados.

Às técnicas, estagiárias e funcionárias do Laboratório de Óleos e Gorduras, Alaíde, Katrina, Marcella, Ingrid, Priscila e Tatiane pela disponibilidade em ajudar.

À Liliana e Sylvio, pela amizade, incentivo e ensinamentos.

Aos amigos e conterrâneos Carolina Lima e Rodrigo Cavalcanti, pelo carinho, apoio e incentivo.

Aos amigos queridos que conheci aqui Carina Lima, Carolina Scultori, Juliano Fiori, Carlos Suzart, Anderson Dias, Noelia Bedoya, Júlio César Rodriguez.

Aos meus amigos de “moras” Caio Sanfelice, Mírian “Tsunami”, Rosângela Santos e Érika Isabela. Obrigada pelo carinho, compreensão e amizade. Foram muitas emoções!

Aos meus amigos, irmãos e anjos da guarda, que mesmo de longe torceram por mim, Rony, Carlos André, Sílvia Cláudia, Silvano, Anderson Montenegro, Ivonaldo, Leonardo Pessoa e Cristiane Kelly.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de forma direta ou indireta, contribuíram e incentivaram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

***“Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas”***

Luis Fernando Veríssimo

RESUMO

Processo simplificado para a produção de concentrado de ácidos graxos de cadeia longa (D-003) a partir da cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

A cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) obtida da torta de filtro, um subproduto da indústria de açúcar e álcool, tem despertado grande interesse devido ao grande potencial de aplicação em diversos segmentos industriais, incluindo a indústria farmacêutica. O Brasil é o maior produtor de cana e maior exportador de açúcar do mundo, o que o torna um potencial produtor de cera de cana dado o grande volume de torta de filtro disponível. A cera de cana é composta de uma mistura de ésteres de cera, triacilgliceróis, esteróis, ácidos e álcoois graxos de cadeia longa, apresentando alto ponto de fusão e composição química extremamente complexa, o que dificulta seu manuseio e análise. É uma fonte de ácidos graxos alifáticos primários de cadeia longa, os quais têm apresentado efeitos antiplaquetários, antitrombóticos e de redução do colesterol sanguíneo, comprovados através de diversos estudos realizados em animais e humanos. Neste trabalho foi estudada a obtenção de um Concentrado de Ácidos Graxos de Cadeia Longa (CAGCL), denominado D-003, através de um processo simplificado contendo 3 etapas: saponificação da cera, extração com etanol anidro a quente e acidulação dos sais de ácidos graxos para obtenção do concentrado. Foram avaliados o rendimento e pureza dos concentrados obtidos e estes derivatizados por três metodologias distintas para posterior análise cromatográfica. Houve variações nos resultados entre as metodologias de derivatização utilizadas, porém pôde-se ter uma noção da faixa de concentração de ácidos e álcoois presentes nos concentrados estudados. Os CAGCL apresentaram rendimento, em massa, ao redor de 40% em relação à cera clarificada e purificada. O concentrado que apresentou maior teor de ácidos graxos (38,9%) foi extraído 3 vezes com etanol à quente, utilizando relação cera saponificada:etanol 1:5-1:3-1:3 (p/v). A obtenção do CAGCL utilizando o processo simplificado proposto é viável

tecnicamente, com pureza dependente da quantidade de extrações e volume de etanol empregado. Para a correta e segura quantificação dos concentrados de ácidos graxos é indispensável o desenvolvimento de uma metodologia analítica para este tipo de amostra.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum* L., cera de cana-de-açúcar, D-003, ácidos graxos de cadeia longa.

ABSTRACT

Simplified process to production of concentrated long chain fatty acids from sugar cane wax (*Saccharum officinarum* L.)

The sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax obtained from filter cake, a by-product of the sugar and alcohol industries, has attracted great interest due to the large potential for application in various industrial sectors, including the pharmaceutical industry. Brazil is the largest sugar cane producer and sugar exporting country in the world, making it a potential sugar cane wax producer due to the large volume of filter cake available. Sugar cane wax is composed of a mixture of wax esters, triacylglycerols, sterols, long chain fatty acids and alcohols with a high melting point and extremely complex chemical composition, making handling and analysis difficult. It is a source of long-chain aliphatic primary fatty acids which have shown anti-platelet effects, anti-thrombotic and cholesterol-lowering effects, demonstrated by several studies in animals and humans. This research was conducted to obtain long chain fatty acids concentrate (LCFAC), called D-003, through a simplified process involving three steps: saponification of the wax; extraction with hot anhydrous ethanol and acidulation of fatty acids salts. The yield and purity of the concentrates were evaluated using three different derivatization methods before gas chromatographic analysis. Differences between the methods were detected, but the range of these results provides a prediction of the concentration range of acids and alcohols present in the concentrates. The LCFAC had yield around 40% in comparison to the clarified and purified wax. The concentrate with the highest fatty acids content (38.9%) was extracted 3 times with hot ethanol, using the proportion of saponified wax: ethanol 1:5-1:3-1:3 (w/v). LCFAC using the simplified process proposed is technically viable, but purity depends on the amount of extraction and volume of ethanol used. For the accuracy and safe measurement of concentrated fatty acids the development of an analytical methodology appropriate for this kind of sample is essential.

Key words: *Saccharum officinarum* L., sugar cane wax, D-003, long chain fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Áreas de plantação de cana-de-açúcar e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil (SETOR..., 2009)	41
Figura 2 -Esquema de obtenção do D-003, segundo González et al. (Patent CU22723, 1997).....	52
Figura 3 -Esquema geral do processo de obtenção dos ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada em nível laboratorial.	72
Figura 4 -Etapa de separação das frações de ácidos (inferior) e álcoois (superior) graxos, utilizando funil de separação em estufa com aquecimento. Ensaio 5.....	77
Figura 5 -Esquema geral do processo de obtenção dos concentrados de álcoois e ácidos graxos a partir da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, através de destilação molecular (ROHR;TRUJILLO-QUIJANO, 2000).....	79
Figura 6 -Cera de cana clarificada e purificada e cera saponificada (Ensaio 1).....	87
Figura 7 -(a) Contaminação da fração insolúvel (marrom) pela fração solúvel (pontos claros). Frações solúvel (b) e insolúvel (c) em álcool etílico quente (Ensaio 1).....	88
Figura 8 -Concentrado de ácidos graxos da cera de cana (Ensaio 2)	89
Figura 9 -Concentrado de álcoois graxos da cera de cana, resultantes das 3 extrações com álcool etílico a quente (Ensaio 3). Da esquerda para direita: extração 1, 2 e 3.....	89
Figura 10 -Concentrado de álcoois graxos (a) e ácidos graxos (b) da cera de cana (Ensaio 4).	90
Figura 11 -Concentrado de álcoois graxos (a) e ácidos graxos (b) da cera de cana (frações com solvente - Ensaio 5).....	91
Figura 12 -Concentrado de álcoois graxos (CALGD), ácidos graxos (CAGD) e cera saponificada (CS) obtidos por destilação molecular. (a) Frações sólidas e (b) Frações em raspas.	94
Figura 13 -Curvas de calibração do octacosanol (A) e do ácido octacosanóico (B) utilizadas para a determinação dos teores de álcoois e ácidos graxos nas amostras de cera de cana.	96
Figura 14 -Cromatogramas para cálculo dos fatores de resposta ao detector, dos álcoois e ácidos graxos.....	97
Figura 15 -Cromatograma de ácidos e álcoois graxos da cera de cana clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste A.....	99

Figura 16 -Concentração de álcoois e ácidos graxos totais da cera de cana-de-açúcar derivatizada por diferentes métodos. Médias de um mesmo composto acompanhadas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância. Teste E (saponificação 60', esterificação 40').....	112
Figura 17 -Concentração de álcoois e ácidos graxos totais do concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular (CAGD), derivatizado por diferentes metodologias. Médias de um mesmo composto acompanhadas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância. Teste E (saponificação 60', esterificação 40').....	113
Figura 18 -Derivatização da amostra de cera de cana-de-açúcar segundo metodologia descrita por Lepage e Roy (1986).....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes encontrados nas ceras de superfície de plantas	31
Tabela 2 - Composição e propriedades de algumas ceras comerciais	37
Tabela 3 - Classificação científica de <i>Saccharum officinarum</i> L	39
Tabela 4 - Composição química da cana-de-açúcar.....	40
Tabela 5 - Composição típica da torta de filtro de cana-de-açúcar (expressa em % de matéria seca)	43
Tabela 6 - Propriedades físico-químicas de ceras brutas de cana-de-açúcar, segundo vários autores.....	50
Tabela 7 - Propriedades físico-químicas de ceras purificadas de cana-de-açúcar, segundo vários autores.....	50
Tabela 8 - Composição em ácidos graxos da fração D-003 obtida da cera de cana-de-açúcar	53
Tabela 9 - Condições dos testes de derivatização das amostras de cera segundo Hartman e Lago (1973).....	66
Tabela 10 - Concentrações do ácido octacosanóico, octacosanol e padrões internos, utilizados na elaboração das curvas padrões dos ácidos e álcoois graxos.....	69
Tabela 11 - Condições de realização dos ensaios para obtenção do concentrado de ácidos graxos de cadeia longa em escala laboratorial.	77
Tabela 12 - Amostras utilizadas nos testes, segundo metodologia de derivatização de Hartman e Lago (1973).....	80
Tabela 13 - Características físico-químicas da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada.	83
Tabela 14 - Rendimento dos ensaios para obtenção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar.....	92
Tabela 15 - Rendimento do processo de obtenção dos concentrados de álcoois e ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar, por destilação molecular.	94
Tabela 16 - Fatores de resposta dos padrões de ácidos e álcoois graxos derivatizados segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).....	98
Tabela 17 - Composição em ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de Hartman e Lago (1973), em diferentes condições (Teste A, B, C, D, E e F).....	101
Tabela 18 - Composição em álcoois graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de Hartman e Lago (1973), em diferentes condições (Teste A, B, C, D, E e F).....	102

Tabela 19 - Concentração de álcoois e ácidos graxos totais da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de Hartman e Lago (1973), em diferentes condições (Teste A, B, C, D, E e F).	104
Tabela 20 - Composição em ácidos e álcoois graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada , derivatizada segundo Hartman e Lago (1973), Lepage e Roy (1986) e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).	107
Tabela 21 - Composição em ácidos e álcoois graxos do concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular , derivatizado segundo Hartman e Lago (1973), Lepage e Roy (1986) e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).	108
Tabela 22 - Composição em ácidos e álcoois graxos do concentrado de ácidos graxos obtidos nos Ensaios 1 e 3, derivatizado segundo Hartman e Lago (1973), Lepage e Roy (1986) e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).	109
Tabela 23 - Teores* (%) de álcoois e ácidos graxos totais da cera de cana-de-açúcar e concentrados, derivatizadas por diferentes métodos.	111
Tabela 24 - Teores* de álcoois e ácidos graxos totais dos concentrados de ácidos graxos obtidos em escala laboratorial.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAGD	Concentrado de Ácidos Graxos Destilado
CALGD	Concentrado de Álcoois Graxos Destilado
IA	Índice de acidez
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
II	Índice de iodo
IS	Índice de saponificação
MI	Matéria insaponificável
PF	Ponto de fusão
CG-MS-APCI	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CG	Gas Chromatography
CG-FID	Gas Chromatography - Flame Ionization Detector
CI	Chemical Ionization
EI	Electron Impact
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
HT-GC	High Temperature - Gas Chromatography
LDL	Low Density Lipoprotein
SFC	Supercritical Fluid Chromatography
SFC-MS	Supercritical Fluid Chromatography - Mass Spectrometry
TLC	Thin Layer Chromatography

APÊNDICE

Tabela A.1 - Composição em ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar purificada, segundo vários autores	133
Tabela A.2 - Composição em álcoois graxos da cera de cana-de-açúcar purificada, segundo vários autores.....	133
Tabela A.3 - Composição e concentração em ácidos e álcoois graxos dos concentrados de álcoois graxos da cera de cana-de-açúcar obtidos por destilação molecular (CALGD) e em escala laboratorial (CALG).....	137
Tabela A.4 - Composição e concentração em ácidos e álcoois graxos dos concentrados de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar obtidos em escala laboratorial, derivatizados segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008)	138
Figura A.1 - Determinação comparativa da composição e concentração de álcoois e ácidos graxos em cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de (A) Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste E, (B) Lepage e Roy (1986) e (C) Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).	134
Figura A.2 - Determinação comparativa da composição e concentração de álcoois e ácidos graxos do concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular (CAGD), derivatizado segundo metodologia de (A) Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste E, (B) Lepage e Roy (1986) e (C) Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).	135
Figura A.3 - Determinação comparativa da composição e concentração de álcoois e ácidos graxos do concentrado de ácidos graxos obtido em escala laboratorial, derivatizado segundo metodologia de (A) Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste A (Amostra do Ensaio 1), (B) Lepage e Roy (1986) (Amostra do Ensaio 1) e (C) Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008) (Amostra do Ensaio 3).	136

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. Objetivos	30
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1. Ceras	31
2.1.1. Definição e características gerais	31
2.1.2. Classificação das ceras	32
2.1.3. Principais ceras comerciais	32
2.1.4. Principais componentes encontrados nas ceras	33
2.1.5. Propriedades físicas e químicas das ceras.....	35
2.1.6. Aplicações das ceras comerciais.....	37
2.2. Cana-de-açúcar.....	39
2.2.1. Cera de cana-de-açúcar	43
2.2.1.1. Extração da cera de cana-de-açúcar	45
2.2.1.2. Purificação da cera de cana-de-açúcar	46
2.2.1.3. Clarificação da cera de cana-de-açúcar	48
2.2.1.4. Propriedades físico-químicas da cera de cana-de-açúcar	49
2.2.2. Ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar.....	51
2.2.2.1. Definição	51
2.2.2.2. Obtenção do concentrado de ácidos da cera de cana-de-açúcar	51
2.2.2.3. Determinação da composição e do teor de ácidos graxos de cadeia longa	54
2.2.2.4. Efeitos farmacológicos atribuídos ao concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar	57
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1. Material	61
3.1.1. Matéria-prima	61
3.1.2. Reagentes, solventes e padrões	61
3.1.3. Equipamentos	62

3.2. Métodos	62
3.2.1. Caracterização físico-química da cera clarificada e purificada.....	62
3.2.1.1. Ácidos Graxos Livres (AGL) e Índice de Acidez.....	62
3.2.1.2. Índice de saponificação	63
3.2.1.3. Índice de iodo	63
3.2.1.4. Teor de matéria insaponificável	63
3.2.1.5. Ponto de fusão (Método do Tubo Capilar Fechado)	64
3.2.1.6. Ponto de amolecimento (Método do Tubo Capilar Aberto)	64
3.2.1.7. Teor de umidade	65
3.2.1.8. Teor e Composição em ácidos e álcoois graxos.....	65
3.2.1.8.1 Derivatização das amostras de cera de cana-de-açúcar segundo metodologia descrita por Hartman e Lago (1973)	65
3.2.1.8.2 Derivatização das amostras de cera de cana-de-açúcar segundo metodologia descrita por Lepage e Roy (1986).....	66
3.2.1.8.3 Derivatização das amostras de cera de cana-de-açúcar segundo metodologia descrita por Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008)	67
3.2.1.8.4 Condições cromatográficas para determinação da composição e teores dos álcoois e ácidos graxos da cera de cana-de- açúcar	67
3.2.1.8.5 Identificação e quantificação dos álcoois e ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar derivatizados segundo metodologia de Hartman e Lago (1973) e Lepage e Roy (1986)	68
3.2.1.8.5.1 Determinação dos fatores de resposta ao detector com derivatização dos padrões de álcoois e ácidos graxos.	69
3.2.1.8.6 Identificação e quantificação dos álcoois e ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar derivatizados segundo metodologia de Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008)	70
3.3. Procedimento Experimental.....	71
3.3.1. Armazenamento da cera clarificada e purificada	71
3.3.2. Caracterização da matéria-prima.....	71

3.3.3. Estudo do processo de produção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar em nível laboratorial	71
3.3.4. Descrição das etapas gerais para a obtenção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar em nível laboratorial.....	73
3.3.4.1. Etapa 1 – Saponificação.....	73
3.3.4.2. Etapa 2 – Separação das frações dos álcoois e dos ácidos graxos.....	73
3.3.4.3. Etapa 3 – Acidificação dos sais de ácidos graxos (sabões).....	74
3.3.5. Ensaios laboratoriais para obtenção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar	75
3.3.5.1. Ensaio 1: Separação das frações utilizando 3 extrações	75
3.3.5.2. Ensaio 2: Única extração para separação das frações	75
3.3.5.3. Ensaio 3: Alteração na proporção de etanol:cera (extrações).....	76
3.3.5.4. Ensaio 4: Alteração no tempo de saponificação	76
3.3.5.5. Ensaio 5: Alteração no tempo de saponificação, proporção de etanol:cera (extração) e utilização de funil de separação em estufa para separação das frações	76
3.3.6. Processo de produção do concentrado de ácidos graxos por destilação molecular.....	78
3.4. Determinação da composição e concentração em álcoois e ácidos graxos da cera de cana purificada e seus extratos	79
3.4.1. Amostras de cera derivatizadas segundo metodologia descrita por Hartman e Lago (1973).....	80
3.4.2. Amostras de cera derivatizadas segundo metodologia descrita por Lepage e Roy (1986).	80
3.4.3. Amostras de cera derivatizadas segundo metodologia descrita por Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).....	81
3.5. Análise estatística	81
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1. Características físico-químicas da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada.....	83
4.2. Estudo do processo de produção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar em nível laboratorial.....	87

4.2.1. Ensaio 1: Separação das frações utilizando 3 extrações.....	87
4.2.2. Ensaio 2: Única extração para separação das frações.....	88
4.2.3. Ensaio 3: Alteração na proporção de etanol:cera	89
4.2.4. Ensaio 4: Alteração no tempo de saponificação	90
4.2.5. Ensaio 5: Alteração no tempo de saponificação, proporção de etanol:cera (extração) e utilização de funil de separação em estufa para separação das frações	91
4.3. Processo de produção do concentrado de ácidos graxos por destilação molecular.....	93
4.4. Determinação dos fatores de resposta ao detector para o cálculo das concentrações em álcoois e ácidos graxos das amostras de cera de cana-de-açúcar.	95
4.4.1. Determinação dos fatores de resposta ao detector com derivatização dos padrões de álcoois e ácidos graxos segundo Hartman e Lago (1973).....	95
4.4.2. Determinação dos fatores de resposta ao detector com derivatização dos padrões de álcoois e ácidos graxos segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).....	98
4.5. Composição e concentração de ácidos e álcoois graxos nas amostras de cera derivatizadas segundo Hartman e Lago (1973)	98
4.6. Determinação comparativa da composição e concentração de álcoois e ácidos graxos em cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada e concentrados, derivatizada por diferentes métodos.....	106
4.7. Comparação entre as concentrações de ácidos e álcoois graxos dos concentrados de ácidos graxos obtidos em escala laboratorial.	115
5. CONCLUSÕES.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
APÊNDICE.....	131

1. INTRODUÇÃO

A cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), assim como outras ceras vegetais, consiste em uma mistura complexa de ésteres de cera, esteróis, ésteres de esteróis, álcoois e ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, cetonas, aldeídos e, também, lipídios mais simples como triacilgliceróis. A presença destes compostos varia quantitativamente, dependendo de um número muito grande de fatores como variedade da cana, solo, processo de extração e purificação (VILLAR et al., 2005).

As ceras apresentam propriedades importantes para sua utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica, química, cosmética, de limpeza e polimento entre outras.

Extraída da torta de filtro, um subproduto da indústria sucro-alcooleira, a cera de cana-de-açúcar tem sido vista como uma alternativa às ceras vegetais, animais e sintéticas utilizadas atualmente. Forma-se em depósitos localizados, principalmente perto dos nós da cana e das bainhas foliares. Na planta, tem a função de proteção contra a perda de água por evaporação, o que a torna mais ou menos abundante, conforme a umidade do ambiente (ADAMENAS, 1982).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e maior exportador de açúcar do mundo. Considerando o conteúdo de cera presente na cana, que pode ser extraída a partir das tortas de filtro (7,0%) (GANDRA, 2006; VIEIRA, 2003) e a quantidade de torta produzida atualmente, o Brasil pode se tornar grande produtor de cera de cana-de-açúcar.

Além de sua aplicação industrial, sua composição química tem chamado atenção devido à cera de cana-de-açúcar ser uma fonte natural de álcoois e ácidos graxos alifáticos de cadeia longa e que apresentam propriedades farmacológicas. Vários estudos clínicos envolvendo humanos e animais relacionaram os efeitos desses compostos como agentes antiplaquetários, antitrombóticos (MOLINA et al., 2000, 2002, 2005), protetores contra peroxidação lipídica e de redução do colesterol sanguíneo (CASTAÑO et al., 2002, 2003;

GOUNI-BERTHOLD; BERTHOLD, 2002; PÉREZ, et al., 2008), assim como ausência de efeitos tóxicos e carginogênicos (GÁMEZ et al., 2007a, 2007b; RODRÍGUEZ et al., 2003; SAUCEDO et al., 2007), podendo ser utilizados como medicamentos naturais e seguros.

O estudo da obtenção de uma das frações majoritárias da cera de cana-de-açúcar (ácidos graxos) é de grande relevância, podendo agregar valor a um subproduto da indústria sucro-alcooleira utilizado, atualmente, apenas como fertilizante nos próprios canaviais.

As ceras apresentam composição química muito complexa, dificultando a análise de seus componentes. Muitas vezes é necessária a separação das classes de lipídios existentes na cera através de CCD (Cromatografia de Camada Delgada), ou outro método, para identificação destas classes utilizando, de preferência, técnicas analíticas combinadas, como por exemplo, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (PARISH; LI; BELL, 2007).

A cromatografia gasosa tem sido a técnica mais utilizada para identificação e quantificação de ácidos graxos em diversas classes de lipídios, inclusive ceras, sendo necessária, na maior parte dos métodos existentes, a derivatização prévia das amostras para conversão dos ácidos graxos em derivados voláteis mais simples, freqüentemente em ésteres metílicos ou outros ésteres.

Várias pesquisas sobre cera de cana-de-açúcar foram desenvolvidas no Laboratório de Óleos de Gorduras (DTA/FEA/Unicamp), desde o ano de 2000, sob a orientação do Professor Daniel Barrera-Arelano (DTA-UNICAMP), em parceria com a Usina São Francisco (Sertãozinho/SP) e indústria Megh - Ceras e Emulsões. A aluna de doutorado Vieira, T. M. F. S. estudou, entre os anos de 2000 e 2003, o processo de extração de cera de cana-de-açúcar utilizando diferentes solventes (n-hexano, ciclohexano, isopropanol e etanol) como também processos de purificação, aplicando, tanto na extração como na purificação, técnicas de planejamento experimental e análise de superfície de resposta. As propriedades físico-químicas das ceras obtidas foram comparadas com ceras

comerciais de abelha e carnaúba, além de análises do teor de esteróis e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Este trabalho resultou em uma patente (Nº INPI - PI0205153-2 A2) depositada em 2002. Em 2006, Gandra, K. M. estudou em seu mestrado a obtenção e caracterização das ceras brutas de cana orgânica e mista e suas frações, bem como a purificação destas ceras através de dois métodos: método de álcool à frio, onde foi obtido óleo de cera de cana, cera purificada (ésteres de cera) e cera dura (resina); e o método de álcool à quente, obtendo as frações de cera mole (óleo e ésteres de cera) e cera dura (resina). Também em 2006, Rozário, C. H. R. (mestrado) estudou as condições para obtenção do Policosanol (concentrado de álcoois graxos) a partir de cera de cana purificada (método de álcool quente). Foram determinadas as condições mais favoráveis de saponificação da amostra utilizando planejamento experimental. No ano seguinte este processo foi patenteado (Nº INPI - PI0702137-2 A2). O processo de clarificação da cera de cana foi estudado por Botega, D. C. Z. (iniciação científica) que utilizou peróxido de hidrogênio como agente clarificante, sendo patenteado em 2007 (Nº INPI - PI0702141-0 A2). Utilizando como base a pesquisa de Rozário, em 2008, as alunas de mestrado Wada, J. K. e Paixão, A. L. estudaram processos simplificados de obtenção do policosanol a partir de cera de cana clarificada e purificada. Wada utilizou processo de saponificação da cera seguida de extração com etanol à quente e purificação do extrato com acetona, enquanto Paixão utilizou etapas de saponificação, acidulação, concentração (utilizando água quente e etanol à frio) e purificação do concentrado de álcoois graxos utilizando acetona.

Todos os estudos relatados acima foram voltados para caracterização das ceras brutas e purificadas por diferentes métodos e obtenção de concentrados de álcoois graxos provenientes de cera de cana. A produção do concentrado de ácidos graxos a partir de cera de cana foi relatada apenas por pesquisadores de Cuba e ainda não existe patente depositada no Brasil, o que torna o desenvolvimento de um processo de obtenção deste concentrado de grande interesse.

1.1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um processo simplificado para a produção de concentrado de ácidos graxos de cadeia longa a partir de cera cana-de-açúcar clarificada e purificada.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Caracterização da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada.
- Desenvolvimento de um processo de obtenção do concentrado de ácidos graxos, utilizando como solvente de extração apenas o etanol.
- Determinação da composição e concentração em ácidos e álcoois graxos dos concentrados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ceras

2.1.1. Definição e características gerais

O termo cera é geralmente utilizado como referência a uma mistura de compostos apolares de cadeia longa podendo constituir uma ampla gama de diferentes classes químicas, incluindo predominantemente os ésteres de cera e outros constituintes lipídicos tais como os esteróis livres e esterificados, triacilgliceróis, álcoois e ácidos graxos livres, cetonas, aldeídos e hidrocarbonetos. O comprimento de cadeia destes compostos pode variar de C_2 , como no acetato de um éster de cadeia longa, até C_{62} no caso de alguns hidrocarbonetos (SAYERS, 1983; WARTH, 1947). Numa definição estrita, uma cera é o éster de um ácido graxo de cadeia longa com um álcool de cadeia longa (PARISH; LI; BELL, 2007).

As ceras estão presentes na maioria das plantas e agem no controle da respiração e entrada de patógenos (MORRISON III; HOLSER; AKIN, 2006).

A Tabela 1 apresenta os principais componentes encontrados em ceras presentes na superfície de plantas.

Tabela 1 - Componentes encontrados nas ceras de superfície de plantas

Componente	Estrutura	
n-alcanos	$CH_3(CH_2)_xCH_3$	21 a 35C – número ímpar
Alquil ésteres	$CH_3(CH_2)_xCOO(CH_2)_yCH_3$	34 a 62C – número par
Ácidos graxos	$CH_3(CH_2)_xCOOH$	16 a 32C – número par
Álcoois graxos (primários)	$CH_3(CH_2)_yCH_2OH$	22 a 32C – número par
Aldeídos	$CH_3(CH_2)_yCHO$	22 a 32C – número par
Cetonas	$CH_3(CH_2)_xCO(CH_2)_yCH_3$	23 a 33C – número ímpar
Álcoois graxos (secundários)	$CH_3(CH_2)_xCHOH(CH_2)_yCH_3$	23 a 33C – número ímpar
β -dicetonas	$CH_3(CH_2)_xCOCH_2CO(CH_2)_yCH_3$	27 a 33C – número ímpar
Triterpenóides	Esteróis, alpha-amirina, beta-amirina, uvaol, eritrodiool	
Ácidos triterpenóicos	Ácido ursólico, ácido oleanólico, etc.	

Fonte: Christie (2008)

2.1.2. Classificação das ceras

As ceras podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em naturais ou sintéticas. As ceras naturais podem ser classificadas em vegetais, animais e minerais. Dentre as ceras 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 ceroso sem nenhum tratamento químico, diferenciando-se das sintéticas, que adquirem esta característica por meio de síntese. A cera de abelha (*Apis spp.*) e a lanolina são importantes ceras animais. Exemplos de ceras vegetais incluem a cera de carnaúba (*Copernicia prunifera*), denominada a “rainha das ceras”, cera de ouricuri (*Syagrus coronata*, *Cocos coronata*) e cera de candelila (*Euphorbia cerifera*). Estas três ceras perfazem o maior volume de consumo mundial das ceras vegetais (COUPLAND; NICHOLS, 1997; PARISH; LI; BELL, 2007). 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 (MUÑOZ, 2005; PARISH; LI; BELL, 2007).

2.1.3. Principais ceras comerciais

A cera da folha de palma da carnaúba é a cera vegetal mais importante, tanto do ponto de vista econômico quanto por suas aplicações. É encontrada no Brasil e extraída das folhas da palmeira *Copernicia prunifera*. As árvores crescem a uma altura de 12 a 15 metros tendo uma vida de aproximadamente 50 anos. Quando a palma alcança a idade de 8 anos, o rendimento de cera por folha é de 4 a 7 gramas, sendo o rendimento anual de cera por árvore em média de 150 gramas. A parte central das folhas contém cera de cor clara. A cera das folhas externas pode ser amarelada, cinza esverdeado ou marrom, dependendo das condições climáticas e da idade das folhas (MUÑOZ, 2005). A cera de carnaúba é uma das mais duras e de maior ponto de fusão dentre as ceras naturais, formada principalmente de ésteres de ceras (~85%) acompanhada de pequenas

quantidades de ácidos e álcoois livres, hidrocarbonetos e resinas (CHRISTIE, 2008; MUÑOZ, 2005).

A cera de abelha é a cera natural mais antiga, usada pelo homem e, portanto, a cera animal mais importante (MUÑOZ, 2005). Esta é obtida a partir de secreções das glândulas abdominais na abelha e recuperada como subproduto após a colheita do mel, sendo que sua composição é variável conforme a espécie de abelha e o tipo de tratamento fornecido à colméia (CHRISTIE, 2008).

A cera de abelha pode ter uma coloração que vai desde o amarelo até o marrom escuro, dependendo dos compostos corantes solubilizados na cera e que podem ser eliminados mediante tratamento com carvão ativo, silicatos de magnésio e alumínio, e outras terras descolorantes. Quando as ceras de abelha são clarificadas, apresentam uma coloração entre amarelo claro e marfim, além de serem praticamente inodoras e insípidas. Grande parte da produção de cera de abelha é reutilizada por apicultores para a fabricação de lâminas para colméias. É também utilizada em cosméticos e produtos farmacêuticos, bem como no setor alimentício. A disponibilidade anual da produção da cera de abelha está diretamente ligada a variações climáticas, bem como as doenças que podem afetar os insetos (MUÑOZ, 2005).

A cera de candelila é uma cera vegetal produzida principalmente no México. É utilizada na fabricação de gomas de mascar, cosméticos e representam cerca de 40% do mercado. Também é utilizada na produção de lubrificantes e em revestimentos de papéis (PARISH; LI; BELL, 2007).

2.1.4. Principais componentes encontrados nas ceras

Como já visto anteriormente, as ceras podem constituir-se de uma ampla gama de diferentes classes químicas. Os ésteres 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; HARWOOD; PADLEY, 1986). Existem diversas fontes na natureza para ésteres de cera de origem animal e vegetal. Um dos ésteres de cera mais conhecidos é a lanolina, com uma complexa composição formada por cerca de 200 tipos de ácidos graxos, incluindo ácidos lineares (C8-C38), ácidos de cadeia ramificada (C7-C41) e hidroxiácidos (C10-C36) (COUPLAND; NICHOLS, 1997). Os ésteres de cera são pouco solúveis em solventes orgânicos, de constante dielétrica alta, mas solúveis em éter etílico, benzeno e clorofórmio. A reação de saponificação dos ésteres de alto peso molecular é complicada devido à baixa solubilidade dos mesmos. A reação de hidrólise dos ésteres de cera também é bastante lenta (PARISH; LI; BELL, 2007).

Os ácidos graxos de cadeia longa presentes em ceras de plantas 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; HARWOOD; PADLEY, 1986). O ácido palmítico (C16:0) é o ácido predominante em ceras de abelha (NEGRI et al., 2000), mas cadeias mais longas, com 30 e 32 carbonos, ocorrem na cera de carnaúba (WARTH, 1947).

Álcoois graxos livres ou esterificados encontram-se amplamente distribuídos nas ceras animais e vegetais e possuem de 20 a 40 átomos de carbono. Álcoois graxos de cadeia longa e esteróis, hidrolisados numa reação normal de saponificação, são encontrados junto com hidrocarbonetos na fração insaponificável, devido à sua insolubilidade em álcool e água (WARTH, 1947).

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, 2008). São moléculas apolares e dissolvem-se apenas em solventes apolares como benzeno e em alcanos líquidos (gasolina, querosene, etc.) (WARTH, 1947).

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).

Kanya, Rao e Sastry (2007) estudaram a composição da cera bruta de semente de girassol obtida de unidades de refino de óleo, utilizando cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). A composição das frações de cera foi basicamente: 66% de ésteres de cera (sendo 62% da fração álcool e 37% da fração de ácidos), 10% de álcoois graxos livres (C18 –C32) e 16% de ácidos graxos livres (C16-C30).

2.1.5. Propriedades físicas e químicas das ceras

As propriedades físicas e tecnológicas das ceras dependem mais de sua estrutura molecular do que de seu tamanho e constituição química. Podem dispersar pigmentos e formar emulsões com água, tornando-as úteis em indústrias farmacêuticas, de móveis e de alimentos (PARISH; LI; BELL, 2007).

As ceras podem ser caracterizadas por uma série de propriedades como cor, índice de acidez, índice de saponificação, índice de éster, ponto de fusão e penetração (consistência), entre outros. Normalmente os métodos utilizados são adaptações daqueles aplicados à análise de óleos e gorduras (HAMILTON, 1995; VIEIRA, 2003).

Algumas propriedades físicas, como os pontos de fusão e de amolecimento, são parâmetros importantes para a definição da aplicação de ceras. As propriedades térmicas das substâncias, tais como as transições de fase, têm um papel decisivo na qualidade do produto final, podendo ser convenientemente estudadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) (GANDRA, 2006).

Constantes químicas são determinadas para identificar, diferenciar ou classificar as ceras. O índice de saponificação é característico para a maioria das

ceras. Este representa a quantidade de ácidos graxos livres e esterificados na amostra. O índice de saponificação é dado pelo número em miligramas de hidróxido de potássio necessário para hidrolisar um grama de cera (LI; PARISH, 1998).

O índice de acidez indica a quantidade de ácidos graxos livres presentes em uma amostra. O tolueno é o mais adotado como solvente de diluição de amostras de cera durante essas determinações, pois além de permitir uma boa solubilização da cera, é miscível com as soluções alcalinas alcoólicas utilizadas (LI; PARISH, 1998; WARTH, 1947). Através da relação entre esses índices pode-se estimar a razão entre ésteres e ácidos graxos livres (HWANG et al., 2002).

O índice de iodo expressa a quantidade de iodo que é absorvida pela cera, fornecendo uma indicação do grau de insaturação da amostra (LI; PARISH, 1998).

A determinação do teor de matéria insaponificável também é importante na caracterização de ceras. A matéria insaponificável inclui todas as substâncias que permanecem insolúveis na água após a saponificação total da cera com álcali. Para tanto, deve ser usado um solvente adequado para a separação seletiva das fases. Geralmente, a matéria insaponificável é formada por álcoois graxos e hidrocarbonetos, se presentes. A maioria dos ésteres de cera contém entre 50% e 55% de álcoois graxos, livres e esterificados, enquanto que os triacilgliceróis apresentam no máximo 1 a 2% de álcoois, sendo que o glicerol liberado pela hidrólise dos triacilgliceróis é solúvel em água (WARTH, 1947).

A composição e propriedades de algumas ceras comerciais estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição e propriedades de algumas ceras comerciais

	Cera de Abelha	Lanolina	Carnaúba	Candelila	Ouricuri	Jojoba
Composição (%)						
Ésteres de cera	70-80 ^a		84-85	28-29		~100
Ácidos	12-15		3-4	7-9		-
Álcoois	-		2-3	12-14 ^b		
Hidrocarbonetos	10-15		2-3	50-51		-
Propriedades						
Ponto de fusão (°C)	62-65	32-42	78-85	67-69	82-84	~7
Índice de acidez (mg KOH/g)	17-36	7-15	3-10	13-18	8-20	2
Índice de saponificação (mg KOH/g)	90-149	100-110	79-95	35-87	70-100	92
Índice de ésteres (mg KOH/g)	64-84	85-100	-	-	75-85	-
Índice de Iodo (mg I ₂ /100g)	7-16	15-30	7-14	14-27	6-8	82

^aPrincipalmente C₄₀-C₅₀^bIncluindo esteróis

Fonte: Gunstone e Padley (1997, p. 44)

2.1.6. Aplicações das ceras comerciais

A utilização de ceras em diversas áreas é extremamente alta. É possível combinar propriedades físicas e químicas de vários tipos de ceras, livremente, através de misturas e preparações. Desta forma, estas são encontradas em quase todas as áreas, porém em diferentes quantidades (MUÑOZ, 2005).

As características particulares de muitas ceras são sua boa capacidade de absorção e habilidade para ligar solventes. As dissoluções de cera formam pastas estáveis e homogêneas ao serem resfriadas. Podem ser aplicadas em superfície e posteriormente polidas depois da evaporação do solvente. As películas de cera resultantes são brilhantes, duras e resistentes à tensão mecânica (MUÑOZ, 2005).

As ceras naturais dividem o mercado com as sintéticas, sendo utilizadas em todas as áreas de aplicação industrial como componentes de produtos para polimento (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); na indústria alimentícia (chicletes, chocolates, frutas) e também na indústria farmacêutica como veículo e excipiente (ADAMENAS, 1982; MUÑOZ, 2005).

No setor alimentício, além do uso como material de revestimento com função de proteção (queijos e frutas), as ceras são utilizadas na elaboração de emulsões e biofilmes (GREENER-DONHOWE; FENNEMA, 1993). Emulsões de cera são utilizadas para retardar a deterioração de algumas frutas cítricas, pois as ceras naturais são componentes adequados para emulsões alimentícias por serem inertes e por sua dispersibilidade. Emulsões do tipo cera em água podem ser mais estáveis que emulsões tipo óleo em água, devido ao alto peso específico da cera, como no caso da candelila (HERNANDEZ; BAKER, 1991). A utilização de cera de carnaúba na elaboração de filmes protéticos promove uma melhoria nas propriedades de barreira ao vapor e à umidade, acompanhada por melhoria na propriedade de extensão dos filmes. O produto resultante é comestível e biodegradável (WELLER; GENNADIOS; SARAIVA, 1998).

É importante destacar que, em vários países, o uso de ceras naturais em diferentes produtos é permitido por órgãos como FDA (Food and Drug Administration) ou equivalentes (MATTHIES, 2001).

Estudos mais recentes relatam o uso de ceras na formulação de organogéis formados por dispersão de cera em óleo vegetal, que são produtos alternativos ao uso de gorduras modificadas quimicamente, apresentando propriedades de plasticidade semelhantes. Toro-Vazquez e colaboradores (2007), estudaram a formação de organogéis em dispersões de cera de candelila em óleo de girassol, nas concentrações de 0,5 a 6% (cera em óleo). Os melhores resultados obtidos pelos autores foram com organogéis na concentração de 3%, onde não foram observadas separações de fases em até três meses, à temperatura ambiente, apresentando texturas de interesse potencial na indústria de alimentos.

Na indústria farmacêutica, as ceras como as de arroz, carnaúba, abelha, cana-de-açúcar e germe de trigo, também são amplamente aplicadas por apresentarem, em sua composição, ácidos e álcoois graxos de cadeia longa. Estudos relatam a eficácia destes compostos sob diversos aspectos relacionados à saúde, como diminuição do colesterol, proteção contra oxidação das lipoproteínas do plasma, efeitos antitrombótico e hipocolesterolêmico (ARRUZABALA et al., 2003; HARGROVE; GREENSPAN; HARTLE, 2004).

2.2. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) é uma planta da família das gramíneas, pertencente ao gênero *Saccharum*, com grande número de variedades. Apresenta colmo (caule), raízes, folhas e, eventualmente, 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 atinge até seis metros de altura (MARTUCCI¹, 1983 apud ROZÁRIO, 2006). As espécies de cana-de-açúcar são provenientes do Sudeste Asiático (DANIELS; ROACH, 1987). Inicialmente era cultivada a espécie *S. officinarum* L., entretanto, os cultivares desta espécie passaram a sofrer doenças e dificuldades de adaptação ecológica. Híbridos interespecíficos, provenientes de programas de melhoramento genético, mais resistentes e adaptados a diversas condições climáticas, permitiram a expansão da cultura pelo mundo (FIGUEIREDO; LANDELL; CAMPANA, 1995; MATSUOKA et al., 1999).

A Tabela 3 apresenta a classificação científica da cana-de-açúcar.

Tabela 3 - Classificação científica de *Saccharum officinarum* L

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisão	<i>Spermatophyta</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Subclasse	<i>Commelinidae</i>
Ordem	<i>Cyperales</i>
Família	<i>Poaceae</i>
Gênero	<i>Saccharum</i> L.
Espécie	<i>Saccharum officinarum</i> L.

Fonte: USDA (2007)

¹ MARTUCCI, E. T. **Tecnologia do açúcar de cana**. Fundação de Pesquisas e Tecnologia, 1983.

A cana-de-açúcar no Brasil é cultivada no Centro-Sul e no Norte-Nordeste, o que permite dois períodos de safra, sendo produzida, portanto, o ano todo. Dependendo do momento do plantio, a cana demora de 12 a 18 meses para ser colhida e processada pela primeira vez (PAIXÃO, 2008). De acordo com Martucci (1983 apud ROZÁRIO, 2006), a cana é formada por diversos compostos, principalmente açúcares e água. A Tabela 4 ilustra os principais componentes encontrados na cana-de-açúcar.

Tabela 4 - Composição química da cana-de-açúcar

Compostos	Teor (%)
Água	65 - 75
Fibras	4 - 14
Açúcares	12 - 18
Cinzas	0,4 - 0,8
Matéria nitrogenada	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
Matéria corante	Não dosadas

Fonte: Martucci (1983 apud ROZÁRIO, 2006)

A cana-de-açúcar é considerada uma importante cultura agrícola, devido à extensa área que seu cultivo ocupa, principalmente em regiões tropicais e temperadas, contribuindo para a alimentação humana e animal e devido também a geração de empregos em função de todo o complexo industrial envolvido em seu cultivo (CARVALHO, 1998). No Brasil, a cana-de-açúcar representa uma cultura de grande valor econômico, utilizada na produção de açúcar para o consumo interno e exportação, e também para a produção de álcool, que representa uma alternativa como substituto da gasolina derivada do petróleo (QUINTELA et al., 1997).

O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil teve início com a colonização portuguesa, sendo uma das primeiras culturas introduzidas no país com fins lucrativos (LUCCHESI, 1995).

Existe amplo consenso a respeito do fato da cana-de-açúcar ser uma matéria-prima de aproveitamento múltiplo, cujos produtos intermediários e finais são dotados de grande versatilidade. Após diversos tipos de processamento industrial, dão origem a grande número de derivados, co-produtos e subprodutos, cujas possibilidades de utilização são também numerosas e variadas. Essa diversidade poderá vir a acentuar-se ainda mais através do tempo e com o progresso técnico. A cana-de-açúcar é, portanto, uma fonte renovável de alimentos, de energia e de materiais variados (SZMRECSÁNYI, 2002).

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar, tendo processado cerca de 569 milhões de toneladas na safra 2008/2009, sendo 90% do total na principal região produtora do País, a Centro-Sul, e 10% no Nordeste. A produção mundial de cana-de-açúcar totaliza quase 1,5 bilhão de toneladas e está localizada predominantemente na faixa tropical do planeta, nos países em desenvolvimento da América Latina, África e do Sudeste Asiático (UNICA, 2009).

A Figura 1 permite localizar (em vermelho), as áreas onde se concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do IBGE, Universidade Estadual de Campinas e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) (SETOR..., 2009).

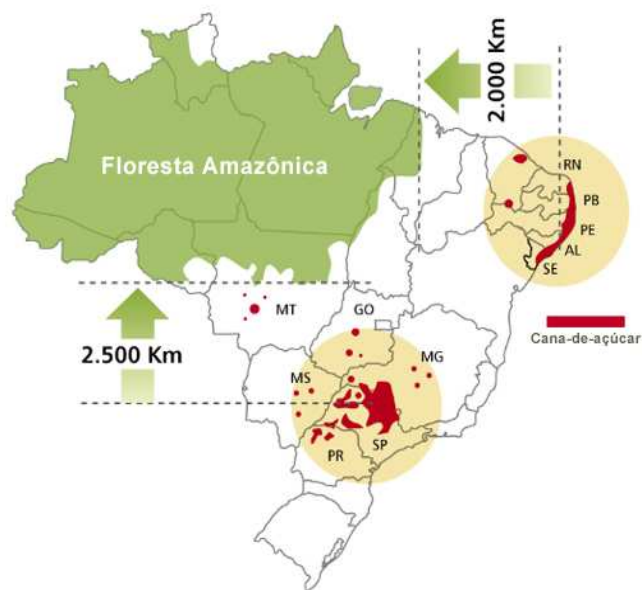


Figura 1 - Áreas de plantação de cana-de-açúcar e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil (SETOR..., 2009)

Dados divulgados pela UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar) permitem observar que na região centro-sul a área de cana disponível para colheita na safra (2008/09) foi estimada em 6,53 milhões hectares (ha), representando aumento de 15,7% (917,9 mil ha) em relação à safra anterior. São Paulo é o maior produtor de cana com área de 4,45 milhões de hectares disponíveis para colheita, representando 66% de toda área de cana da região centro-sul. Apresentou crescimento de 12,2% (483,3 mil ha) de área em relação à safra de 2008 (AVALIAÇÃO..., 2009).

O país possui 330 usinas em atividade, das quais 250 se encontram no Centro-Sul e 80 no Norte e Nordeste. Contam-se ainda 90 novos projetos de construção de usinas no Centro-Sul. Destes, 20 entraram em operação na safra 2005/06 (AGRIANUAL, 2007).

O uso dos produtos e subprodutos da cana permite o desenvolvimento industrial dentro do conceito de ciclo fechado de aproveitamento integral, que inclui até os resíduos, utilizando-os de tal forma que não prejudiquem o meio ambiente e ao mesmo tempo agregando utilidade econômica. Por exemplo, do bagaço, obtém-se diversos tipos de papéis, fármacos e produtos como o furfural, de alta reatividade, para a síntese de compostos orgânicos, com grande número de aplicações na indústria química e farmacêutica (GARCÍA; RODRÍGUEZ; TÍO, 1999).

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

A quantidade e composição das tortas de filtro depende de vários fatores: tipo do solo, variedade da cana, tipo de colheita, eficiência da moagem, método de

clarificação e filtração empregado, tamanho dos furos dos coadores do caldo entre outros fatores (AGUILERA; RUIZ, 1999; BAYMA, 1974; PATURAU, 1989).

A Tabela 5 apresenta os componentes normalmente presentes em tortas de filtro de cana.

Tabela 5 - Composição típica da torta de filtro de cana-de-açúcar (expressa em % de matéria seca)

	Paturau (1989)	Villar et al. (2005)
Lipídios totais	5 – 14	10 – 14
Fibras	15 – 30	18 – 25
Açúcares	5 – 15	10 – 14
Proteína	5 – 15	12 – 16
Cinzas totais	9 – 20	8 – 12
SiO ₂	4 – 10	–
CaO	1 – 4	2,5 – 5
P ₂ O ₅	1 – 3	3 – 5
MgO	0,5 – 1,5	–

A indústria sucro-alcooleira, além dos produtos tradicionais, açúcar e álcool, vem nos últimos anos se mobilizando para encontrar produtos alternativos, derivados de seus produtos principais ou a partir de subprodutos da fabricação destes. Entre os produtos alternativos e de alto valor agregado, a cera de cana-de-açúcar possui um grande potencial, considerando-se o índice de extração da cera (7%) sobre a quantidade de cana processada (GANDRA, 2006; VIEIRA, 2003).

2.2.1. Cera de cana-de-açúcar

Ainda que os lipídios presentes na cana-de-açúcar representem apenas uma pequena porcentagem do seu peso, a cana pode ser tomada potencialmente como uma fonte de cera, considerando-se a quantidade total produzida mundialmente (BALCH, 1953).

Na cana, os lipídios representam aproximadamente 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, tendo como função a proteção contra a perda de água por evaporação. Já a fração oleosa ocorre no interior dos colmos e em outras partes da cana, sendo constituinte essencial do protoplasma celular (PATURAU, 1989).

A quantidade de cera depositada pode variar, dependendo da variedade e idade da cana, sendo também influenciada por outros fatores tais como composição do terreno e as condições climáticas e pluviométricas sob as quais se desenvolve o cultivo (BALCH, 1953; ADAMENAS, 1982).

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

Na clarificação do caldo os lipídios são concentrados na torta, que pode ser utilizada na obtenção de cera, um produto com alto valor agregado (PATURAU, 1989).

Segundo García et al. (2003), de 1 tonelada de cana-de-açúcar processada, pode-se obter 180g (0,018%) de cera refinada.

Vieira (2003) e Gandra (2006), em estudo feito sobre extração de cera de cana-de-açúcar proveniente de tortas de filtro de cana orgânica, obtiveram rendimento de cera bruta de 7,1% (com relação à torta de filtro).

Geralmente, 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 de forma mais rápida (ADAMENAS, 1982).

2.2.1.1. Extração da cera de cana-de-açúcar

Existem vários métodos descritos para a extração de ceras, através do uso de solventes não-polares. Uma vez que as ceras estão ligadas às superfícies de forma hidrofóbica, devem ser extraídas com solventes como hexano, benzeno, clorofórmio, éter de petróleo ou acetona (HWANG et al., 2002). 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, a taxa de evaporação, entre outros. Além disso, o custo é importante, devido às perdas inerentes a qualquer processo de extração por solventes (ADAMENAS, 1982).

A extração de cera bruta de cana-de-açúcar pode ser realizada por dois processos: sólido-líquido e líquido-líquido. O processo mais utilizado é a extração sólido-líquido, semelhante à extração de óleo de sementes e resíduos vegetais. Neste processo é utilizada torta de filtro com umidade residual entre 12% e 15% e um solvente apropriado (hexano, heptano). Na extração líquido-líquido, a torta de filtro, com aproximadamente 85% de umidade, entra em contato em um processo contínuo, com o solvente em contracorrente. A solução de cera bruta é concentrada e a torta é tratada com vapor para recuperação do solvente. (GARCÍA; TÍO; ALVAREZ, 1988).

Nuissier et al. (2002) utilizaram ciclohexano para a extração de cera de resíduos de fermentação e destilação de cana-de-açúcar de fábricas produtoras de rum em um equipamento tipo Soxhlet, por 20 horas, obtendo rendimento de cera bruta de 7%.

García et al. (2003) utilizaram o subproduto cuticular, obtido do descascamento mecânico da cana, para a extração da cera com diferentes solventes: éter de petróleo, tolueno e tricloroetileno. Amostras com 12% de umidade, apresentaram rendimentos de 4,71% (tricloroetileno), 4,18% (tolueno) e 3,73% (éter de petróleo) em cera bruta. A extração foi realizada em equipamento tipo Soxhlet, durante o período de 4 horas.

Vieira (2003) avaliou a eficiência da extração de cera de tortas de filtro de cana orgânica e queimada, utilizando solventes n-hexano, ciclohexano, isopropanol e etanol. As faixas ótimas de trabalho, após otimização do processo com n-hexano, apresentaram relação solvente:matéria-prima de 13:1 a 15:1, tempo de 5 a 6 horas e tamanho máximo de partícula de 4,0 mm. O rendimento de cera bruta obtido com torta de cana orgânica foi de 7,11% e em torta de cana queimada 4,32%.

Gandra (2006) utilizou tortas de filtro de cana orgânica e de cana mista (cana orgânica e cana queimada), para a extração da cera bruta utilizando hexano como solvente de extração, em extrator tipo Soxhlet Piloto. Após a extração, a miscela foi concentrada a vácuo e o solvente foi recuperado. O rendimento obtido foi de 7% de cera bruta em cana orgânica e 5,8% de cera bruta em cana mista.

2.2.1.2. Purificação da cera de cana-de-açúcar

Ceras brutas são extraídas das tortas de filtro de cana utilizando-se solventes orgânicos e apresentam grande quantidade de materiais graxos. São estes compostos lipídicos que conferem propriedades indesejáveis à cera bruta, tais como, caráter viscoso, consistência pegajosa e baixo ponto de fusão. Esta cera apresenta cor escura e geralmente um odor desagradável (BALCH, 1945; GARCÍA; RODRÍGUEZ; TÍO, 1999; PATURAU, 1989). Devido à presença de grandes quantidades de matérias graxas, resinas e algumas impurezas, a cera bruta deve passar por um processo de refino para se obter um produto que possa ter aplicações industriais (MANOHAR RAO, 1997; PHUKAN; BORUAH, 1999).

Os processos de purificação da cera geralmente consistem em dissolvê-la em um solvente orgânico no qual a fração óleo é solúvel, enquanto que a cera e a matéria resinosa são precipitadas. A suspensão formada é filtrada e a parte sólida é misturada com mais solvente e aquecida. A resina é separada da cera em

solução e é eliminada pelo processo de decantação (FRUTUOSO, 1989² apud GANDRA, 2006).

Processos de purificação da cera bruta com álcool (etanol ou isopropanol), resultam em três frações: cera, óleo e resina (fração mais dura da cera de cana). 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 (GARCÍA; RODRÍGUEZ; TÍO, 1999; PHUKAN, 2002).

De acordo com Vieira e Barrera-Arellano (2002), a purificação da cera pode ser realizada através do resfriamento controlado da temperatura, de 50°C a 0°C, de uma mistura de cera bruta com solvente orgânico, em conjunto com a separação da fração precipitada de cera por centrifugação ou filtração. A purificação ainda pode ser feita diretamente sobre a miscela resultante da extração, de forma que diferentes frações de cera precipitada podem ser obtidas através do controle da temperatura durante o resfriamento, e em seguida, a cera precipitada é lavada com solventes e separada por filtração e/ou centrifugação, obtendo-se a cera purificada.

Vieira (2003) obteve cera purificada de cana utilizando o método de cristalização fracionada. Neste método, amostras de ceras brutas (de cana orgânica e queimada) foram fundidas e homogeneizadas com hexano a quente, de acordo com a relação cera:solvente de 1:20 (p/v). A solução foi resfriada à temperatura ambiente e posteriormente a 10°C por 1 hora. Após a centrifugação, o precipitado foi lavado com acetona (2:1, v/p) a 10°C, filtrado e seco em estufa para a obtenção da cera purificada de cana-de-açúcar. A cera purificada de cana orgânica apresentou coloração ligeiramente esverdeada e a cera purificada de cana queimada apresentou coloração esbranquiçada e aspecto quebradiço.

² FRUTUOSO, E. S. **Extração, refinação e estudo das propriedades termodinâmicas de cera de cana-de-açúcar**. 1989. 65p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1989.

Gandra (2006) utilizou dois métodos de purificação da cera bruta de cana-de-açúcar: Método de Álcool a Frio (MAF) e Método de Álcool a Quente (MAQ). No MAF, etanol anidro a 10°C foi adicionado à cera bruta, obedecendo à relação cera bruta:solvente de 1:4 (p/v) e mantido sob agitação por 30 minutos. A mistura foi transferida à uma centrifuga para a separação do óleo e solvente. Ao precipitado, adicionou-se etanol anidro na mesma proporção (1:4) e aqueceu-se a mistura sob refluxo por 15 minutos. A fase superior (solvente e cera purificada) foi separada do precipitado (cera dura). Desta maneira, a partir deste método de purificação foi possível obter três frações chamadas de óleo, cera purificada e cera dura de cana-de-açúcar. O MAQ é diferente do anterior, uma vez que envolve apenas uma etapa de purificação com etanol anidro, obedecendo a relação cera bruta:solvente de 1:4 (p/v). O sistema cera bruta e etanol foi mantido sob refluxo e agitação por 15 minutos. A fase superior (solvente e cera) foi separada do precipitado (cera dura). Neste processo, foram obtidos dois produtos chamados de cera mole (cera purificada + óleo) e cera dura (resina).

Rozário (2006) obteve cera purificada de cana, em escala piloto, também utilizando o MAQ, como descrito por Gandra (2006).

2.2.1.3. 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, não é facilmente separada (PATURAU, 1989; WARTH, 1947).

Azzam (1986) avaliou processos de clarificação de cera de cana-de-açúcar utilizando os seguintes reagentes: ácido crômico, ácido nítrico, cloreto de sódio e clorato de potássio. Os melhores resultados foram obtidos na cera clarificada com ácido crômico, onde as colorações variaram de marrom pálido a amarelo pálido.

Berthold (1993³ apud KRELL, 1996) descreve dois métodos químicos para a clarificação da cera de abelha. No primeiro método, o autor emprega ácido oxálico e, no segundo, peróxido de hidrogênio (30 a 50%), 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.

Botega e Barrera-Arellano (2007) utilizaram peróxido de hidrogênio na clarificação da cera de cana-de-açúcar. Utilizando um planejamento experimental associado à análise de superfícies de resposta, determinaram como sendo as condições ótimas do processo: temperatura 72,5°C, 1 0% de H₂O₂, adicionado em 4 porções, para a cera bruta e temperatura de 72,5°C, 9% de H₂O₂, adicionado em 3 porções, para a cera purificada com etanol a frio, sendo o tempo total do processo, para ambas as matérias-primas, igual a 1 hora. As ceras clarificadas obtidas apresentaram redução, em relação à cera bruta, de 5 para 2 unidades de cor Gardner e de 70,23 (mg/kg) para zero, de teor de clorofila.

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).

2.2.1.4. Propriedades físico-químicas da cera de cana-de-açúcar

García e García (1996⁴ apud GARCÍA et al., 2003) caracterizaram cera de cana-de-açúcar extraída a partir da torta de filtro com hexano e encontraram valores de índice de acidez de 32 mg KOH/g, índice de saponificação de 98 mg KOH/g e índice de iodo de 28 mg I₂/100 g. A cera refinada, obtida a partir do refino da cera bruta com etanol, apresentou menores índices de acidez (27 mg KOH/g) e iodo (21 mg I/100g), e maior índice de saponificação (106 mg KOH/g) comparada com a cera bruta.

³ BERTHOLD, R. **Beeswax crafting**. Wicwas Press, Cheshire, Conn., U.S.A., 1993. 128 p.

⁴ GARCIA, A.; GARCIA, M.A. Soxhlet extraction of crude wax from sugar cane. **The Journal of Tecator**, v. 20, n. 1, 1996.

Outros estudos de caracterização da ceras brutas e purificadas estão apresentados resumidamente nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Propriedades físico-químicas de ceras brutas de cana-de-açúcar, segundo vários autores.

	García e García (1996)	Vieira (2003)	Rozário (2006)	Gandra (2006)	
	CB	CBO	CBQ	CBO	CBM
Índ. acidez (mg KOH /g)	32	52,4	44,5	27,3	34,5
Índ. Iodo - Wijs (mg I ₂ /100g)	28	23	21	33	49
Índ. Saponificação (mg KOH /g)	98	124	120	105	117
Matéria Insaponificável (%)	nd	35,5	36,1	32,4	nd
Ponto de fusão (°C)	nd	nd	nd	71,6	75,3

CB – Cera Bruta de Cana-de-Açúcar

CBO - Cera Bruta Orgânica de Cana-de-Açúcar

CBQ – Cera Bruta Queimada de Cana-de-Açúcar

CBM – Cera Bruta Mista de Cana-de-Açúcar

nd – não determinado

Tabela 7 - Propriedades físico-químicas de ceras purificadas de cana-de-açúcar, segundo vários autores.

	García e García (1996)	Vieira [*] (2003)	Rozário [*] (2006)	Gandra [*] (2006)	Wada (2008)	Paixão (2008)
Índ. Acidez (mg KOH / g)	27	20,5	39,6	23,2	13,0	13,2
Índ. Iodo – Wijs (mg I ₂ / 100g)	21	13	56	22	21	22
Índ. Saponificação (mg KOH /g)	106	78	118	79	96	96
Matéria Insaponificável (%)	nd	55,6	50,8	nd	48,5	48,5
Ponto de fusão (°C)	nd	nd	70,2	78,3	75,0	75,0

^{*} Cera purificada de cana orgânica

nd – não determinado

Após a purificação da cera os índices de acidez, índice de iodo e índice de saponificação diminuem, devido à retirada da fração oleosa da cera, enquanto os valores de matéria insaponificável e ponto de fusão aumentam. Essas alterações, após a purificação, dependem da eficiência e do tipo de processo utilizado para concentrar a fração de ésteres de cera das amostras (VIEIRA, 2003).

Os valores das propriedades físico-químicas das ceras brutas e purificadas encontrados na literatura não são constantes. Segundo Gandra (2006), esta variação está intimamente relacionada com as condições e tipos de solventes utilizados nas etapas de extração e purificação, processos de moagem e, especialmente, com a variedade da cana cultivada.

2.2.2. Ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar

2.2.2.1. Definição

A mistura de ácidos graxos de cadeia longa isolada e purificada da cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) recebe o nome de D-003. Estes ácidos graxos apresentam variações de 24 a 38 átomos de carbono, tendo o ácido 1-octacosanóico (C_{28}) como o principal componente, seguido pelos ácidos 1-triacontanóico (C_{30}), 1-dotriacontanóico (C_{32}) e 1-tetratriacontanóico (C_{34}), enquanto outros ácidos estão presentes em menores concentrações. Essa mistura de ácidos graxos apresenta propriedades farmacológicas específicas podendo ser utilizada como componente ativo de formulações farmacêuticas com efeito hipocolesterolêmico, contra a hipercolesterolemia tipo II, contra agregação plaquetária, trombose e isquemias. Também é efetiva na inibição do desenvolvimento de úlceras gástricas induzidas por diferentes agentes (GONZÁLEZ et al., 1997).

2.2.2.2. Obtenção do concentrado de ácidos da cera de cana-de-açúcar

González et al. (1997) patentearam um processo para a obtenção do D-003 (Figura 2), baseado em uma saponificação homogênea da cera de cana-de-açúcar, com soluções concentradas de hidróxidos alcalinos e alcalinos terrosos, de baixo peso molecular (sódio, potássio ou cálcio). Os autores utilizaram concentrações de hidróxido variando de 5% a 25% e tempo variando de 1 a 5 horas. Com o sólido obtido foi realizada uma extração sólido-líquido (1 a 10 horas)

onde a mistura de ácidos graxos foi extraída empregando-se um solvente orgânico adequado, escolhido entre cetonas de 3 a 8 átomos de carbono, álcoois de 1 a 5 átomos de carbono, hidrocarbonetos de 5 a 8 átomos de carbono e compostos aromáticos ou mistura destes. Em seguida, foi realizada a purificação através de recristalizações sucessivas (1 a 10 horas), utilizando solventes orgânicos específicos (já mencionados) ou soluções aquosas e refluxo (15 minutos a 3 horas) também utilizando um dos solventes orgânicos acima mencionados, seguida de imediata filtração à quente dos sais de ácidos graxos obtidos. Na etapa final deste processo os ácidos graxos livres foram regenerados usando uma solução ácida, que pode ser preparada usando ácidos minerais e/ou ácidos orgânicos. O rendimento da mistura de ácidos graxos ficou entre 10 a 40%, enquanto a pureza na faixa de 85 a 100%, mais especialmente entre 90 e 99%, determinada usando cromatografia gasosa e/ou análises químicas volumétricas.

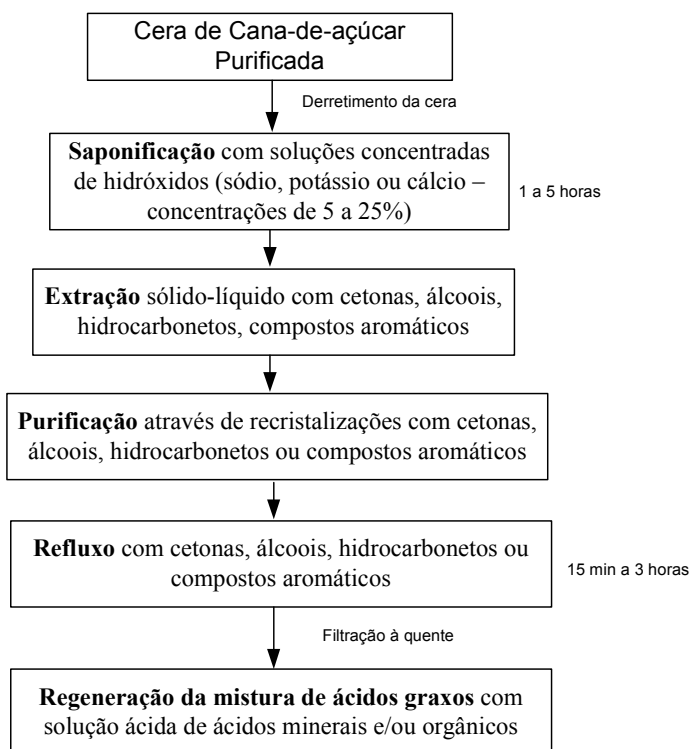


Figura 2 - Esquema de obtenção do D-003, segundo González et al. (Patent CU22723, 1997)

Na Tabela 8 é apresentada a composição qualitativa e quantitativa da mistura de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar obtida por González e colaboradores (1997).

Tabela 8 - Composição em ácidos graxos da fração D-003 obtida da cera de cana-de-açúcar

Componente	Porcentagem do componente na mistura (%)
Ácido hexacosanóico (C ₂₆)	0,3 – 1,5
Ácido octacosanóico (C ₂₈)	25,0 – 50,0
Ácido nonacosanóico (C ₂₉)	1,0 – 3,0
Ácido triacontanóico (C ₃₀)	15,0 – 30,0
Ácido hentriacontanóico (C ₃₁)	0,8 – 3,0
Ácido dotriacontanóico (C ₃₂)	10,0 – 22,0
Ácido tritriacontanóico (C ₃₃)	1,0 – 3,0
Ácido tetratriacontanóico (C ₃₄)	10,0 – 22,0
Ácido pentatriacontanóico (C ₃₅)	0,5 – 1,5
Ácido hexatriacontanóico (C ₃₆)	2,0 – 9,0

Fonte: González et al. (1997)

Em 2006, Matkin e colaboradores patentearam um processo de obtenção de uma mistura de álcoois e ácidos graxos de cadeia longa extraídos de ceras de origem animal e vegetal. Esse processo foi baseado em uma reação de transesterificação de ceras com solução de etóxido (ou metóxido) de sódio. O solvente foi evaporado e o conteúdo restante processado usando destilação molecular para obtenção de uma mistura de álcoois graxos de cadeia longa e ésteres etílicos (ou metílicos) de ácidos graxos. A mistura foi então saponificada e os ácidos graxos de cadeia longa regenerados com ácidos minerais. O rendimento da mistura de álcoois e ácidos graxos de cadeia longa ficou entre 27% e 46,3%, enquanto a pureza na faixa de 96% a 98%. A mistura obtida foi formada por álcoois graxos de cadeia longa com 24 a 34 átomos de carbono e ácidos graxos de cadeia longa com 22 a 38 átomos de carbono. A proporção (em peso) de álcoois e ácidos na mistura foi de 60-95% e 5-40%, respectivamente.

2.2.2.3. Determinação da composição e do teor de ácidos graxos de cadeia longa

O conhecimento das análises químicas de ceras naturais é essencial para compreender a biosíntese, produção e aplicação das ceras. Enquanto as composições químicas das ceras sintéticas são constantes e dependem do processo de fabricação, as ceras naturais são muito mais complicadas em suas composições químicas (PARISH; LI; BELL, 2007).

Uma variedade de técnicas analíticas tem sido utilizada para a caracterização de ácidos graxos alifáticos. Métodos clássicos incluem técnicas como cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia de fluido supercrítico (SFC), ou técnicas conjugadas como CG/MS, SFC/MS, e HPLC/MS. São utilizados diferentes modos de ionização, como por exemplo, impacto elétrico (EI), ionização química (CI), ionização eletrospray (ESI) ou rápido bombardeamento atômico (FAB). Alguns métodos incluem derivatização dos componentes antes da análise. A derivatização e métodos analíticos dependem fortemente do problema específico em estudo (MOLDOVAN; JOVER; BAYONA, 2002).

Em geral, ceras naturais são isoladas por extração química, separadas por métodos cromatográficos e analisadas por meio de espectrometria de massas (MS); ambas, cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), são técnicas utilizadas (PARISH; LI; BELL, 2007).

A cromatografia gasosa tem sido a melhor técnica para determinação de ácidos graxos. Geralmente os ácidos graxos são convertidos em derivados voláteis mais simples, freqüentemente em ésteres metílicos ou outros ésteres.

Antolín et al. (2003), desenvolveram e validaram um método cromatográfico para determinar o conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa em cápsulas contendo 5 mg de concentrado de ácidos graxos de cadeia longa (D-003). O método utilizou coluna capilar DB-5 *wide-bore* e ácido 1-nonadecanóico (C19:0) como padrão interno. Os ácidos foram analisados como derivados de ésteres metílicos, preparados usando solução aquosa de HCl-metanol a 5%. O método

desenvolvido foi específico para o princípio ativo, mesmo quando as amostras foram submetidas a condições de *stress*. Boa linearidade (coeficiente de correlação $> 0,99$) e exatidão (recuperação média total = $99,60\% \pm 1,43\%$) foram obtidas numa faixa de 38-150% da concentração nominal. O método validado permitiu uma determinação precisa dos ácidos graxos contendo 24 a 36 átomos de carbono e foi considerado apropriado para controle de qualidade e estudos da estabilidade daquelas cápsulas.

Em 2003, Vieira analisou a composição em álcoois e ácidos graxos de ceras de cana-de-açúcar, brutas e purificadas, utilizando o método descrito por Pina et al. (1987) com modificações que promoveram a hidrólise total dos ésteres de cera. As amostras foram derivatizadas na presença do reagente de Grignard, que reage com os grupamentos éster da cera, convertendo os ácidos graxos em álcoois terciários, enquanto que os álcoois graxos permaneceram como álcoois primários. Neste método somente os ácidos graxos originalmente esterificados na forma de triacilgliceróis, ésteres de cera e ésteres de esteroide (se presentes) foram convertidos em álcoois terciários, pois o método utilizado não promove a derivatização dos ácidos graxos livres, conforme elucidado por PINA et al. (1995⁵ apud VIEIRA, 2003). Os produtos resultantes foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada (TLC) analítica para atestar a eficiência da reação. Os álcoois primários e terciários foram separados por TLC preparativa e analisados por cromatografia gasosa. As amostras de cera analisadas apresentaram ácidos graxos de 16 a 34 carbonos, com uma predominância do ácido palmítico (C16:0) e octacosanóico (C28:0). A composição em ácidos graxos foi obtida através dos cromatogramas dos álcoois graxos terciários. Os teores de ácidos graxos totais não foram determinados nesta pesquisa.

Gandra (2006) determinou a composição em ácidos graxos da cera bruta de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) obtida a partir de tortas de filtro de cana orgânica e mista (30% de cana queimada e 70% de cana não queimada). As

⁵ PINA, M.; OZENNE, C.; LAMBERET, G.; MONTET, D.; GRAILLE, J. Contribution of Grignard reagents in analysis of short-chain fatty acids. In: SEBEDIO, J. L.; PERKINS, E. G. **New Trends in Lipid and Lipoprotein Analysis**. Champaign: AOCS Press, 1995. Chap.18, p.242-249.

amostras foram preparadas na forma de metil ésteres de ácidos graxos, de acordo com a metodologia proposta por Hartman e Lago (1973), modificando-se o tempo de saponificação para 20 minutos. A identificação dos picos obtidos em cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chama (FID) foi baseada nos valores de tempo de retenção obtidos a partir de amostra de composição conhecida (óleo de mostarda), injetada nas mesmas condições. Os valores de tempo de retenção foram utilizados para a construção de curvas de número de carbono equivalente, que auxiliaram na identificação dos componentes das amostras. As amostras de ceras de cana orgânica e mista apresentaram 69,7% e 64,9% de ácidos graxos saturados, respectivamente. Foram identificados ácidos graxos contendo 14 a 34 átomos de carbono.

Paixão (2008) também utilizou a metodologia de Hartman e Lago (1973) para determinação da composição em ácidos graxos da cera de cana clarificada e purificada, na qual 81,9% foram ácidos graxos saturados, com uma predominância do ácido palmítico (C16:0) e octacosanóico (C28:0) e 18% foram ácidos graxos insaturados, com presença dos ácidos linolênico (C18:3), linoléico (C18:2) e oléico (C18:1). Apenas os teores de álcoois graxos totais foram determinados neste trabalho.

Rezanka e Sigler (2006) descreveram um método de enriquecimento de ácidos graxos de cadeia longa da cera de cana-de-açúcar e sua identificação como ésteres de picolinil, por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa com ionização química a pressão atmosférica (HPLC-MS-APCI). A cera de cana-de-açúcar refinada foi saponificada com solução aquosa de KOH por 30 minutos. Os ácidos graxos foram extraídos em um sistema de extração sólido-líquido utilizando acetona como solvente. O resíduo foi esfriado até temperatura ambiente e extraído com heptano, o pH ajustado para aproximadamente 3 por diluição com ácido sulfúrico e outra extração com heptano foi realizada. Ao final, foram obtidos ácidos graxos de cadeia longa com pureza de 94%. Estes ácidos graxos foram derivatizados em ésteres de picolinil e submetidos à cromatografia líquida preparativa obtendo ácidos graxos C₃₅-C₅₀ derivativos de picolinil. Esta fração enriquecida foi então analisada por HPLC-MS.

A combinação das duas técnicas foi utilizada para identificar ácidos graxos saturados de cadeia longa incomuns, com até 50 átomos de carbono. A fração de ácidos graxos C₂₄-C₃₄ representou um total de 98,72% do total de ácidos graxos e a fração C₃₅-C₅₀ pouco mais de 1,28%.

Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008) desenvolveram um método rápido de metilação e determinação do conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa (D-003) por cromatografia gasosa, em tabletes contendo 5 mg de D-003. A primeira etapa do método consistiu em uma extração a quente, dos ácidos graxos contidos nos tabletes, com clorofórmio. Em seguida ocorreu, simultaneamente, a metilação com solução metanólica de ácido sulfúrico a 2% e a extração dos ésteres formados com n-hexano. Os ésteres foram analisados por cromatografia gasosa utilizando uma coluna DB-5 wide-bore tendo o ácido nocardecanóico (C19:0) como padrão interno. Enquanto no método desenvolvido por Antolín et al. (2003) foram necessários 90 minutos para a máxima eficiência da reação de metilação do D-003, neste método foram necessários apenas 10 minutos para a completa metilação do mesmo. Segundo os autores, os resultados analíticos e o tempo de reação deste método mostraram que este é mais conveniente, em relação ao estudo anterior (ANTOLÍN et al., 2003) para o controle de qualidade e estudos de estabilidade dos tabletes analisados.

2.2.2.4. Efeitos farmacológicos atribuídos ao concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar

O concentrado de ácidos graxos da cana-de-açúcar (D-003) tem efeito de redução de colesterol demonstrado experimentalmente e clinicamente (ARRUZAZABALA et al., 2003; CASTAÑO et al., 2003; MENDONZA et al., 2003; MENÉNDEZ et al., 2001; MOLINA et al., 2000; MOLINA et al., 2002). Administrado oralmente em coelhos por 30 dias, D-003 (5-200 mg/kg/dia) reduziu o colesterol total sérico e o colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) em uma forma dose dependente (GÁMEZ et al., 2000a; MENDONZA et al., 2003). Os efeitos da

redução do colesterol por D-003 em humanos têm sido demonstrados em voluntários normocolesterolêmicos e pacientes com hipercolesterolemia tipo II (CASTAÑO et al., 2002, 2003). Estudos sugerem que o D-003 reduz o colesterol através da inibição da biosíntese do colesterol na etapa entre o consumo do acetato e a produção do mevalonato, regulando a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase (MENÉNDEZ et al., 2001).

Estudos experimentais e clínicos fase I permitiram concluir que D-003 administrado oralmente de forma dose dependente inibe a agregação plaquetária em roedores e voluntários saudáveis (ARRUZAZABALA et al., 2003; CASTAÑO et al., 2002; CASTAÑO et al., 2003). Estes efeitos têm sido associados com mudanças no metabolismo do ácido araquidônico induzidas por D-003, reduzindo significativamente os níveis de tromboxano (TX) B_2 e aumentando os níveis de prostaciclina em roedores e em seres humanos (MOLINA et al., 2000; MOLINA et al., 2002).

O D-003 também aumentou o tempo de sangramento, um efeito não associado com mudanças nos parâmetros de coagulação, mas com inibição da agregação das plaquetas no sangue (GÁMEZ et al., 2002b). Outros estudos relataram que o D-003 tem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica induzida por diferentes agentes em ratos e humanos (CASTAÑO et al., 2003; MENÉNDEZ et al., 2002).

Molina et al. (2005) estudaram o efeito de diferentes doses orais de D-003, em ratos, sobre agregação plaquetária intravascular induzida por colágeno (*in vivo*). Efeitos de doses únicas de D-003 (5, 25, 100, e 200 mg/kg) ou repetidas (1, 5, 25, 100, e 200 mg/kg durante 10 dias) foram estudadas. Os efeitos de doses repetidas foram mais pronunciados do que aqueles obtidos com administração única. A dose efetiva média de 50% de D-003 em ambos os sistemas foi de 2,3 mg/kg, indicando o potencial antitrombótico promissor do D-003.

Alguns estudos vêm sendo realizados em relação aos ácidos graxos encontrados na fração oleosa da cera de cana-de-açúcar. Lédon et al. (2007) avaliaram os efeitos da mistura de ácidos graxos do óleo da cera de cana-de-açúcar – que apresenta como constituintes principais os ácidos palmítico, oléico,

linoléico e linolênico – sobre dois modelos de inflamação: artrite induzida por Zymosan (polissacarídeo derivado da parede celular de fungos que induz a inflamação quando injetado na articulação de ratos e outros animais) e no teste de psoríase em caudas, ambos em ratos. Os resultados deste estudo permitiram sugerir que a aplicação tópica dessa mistura de ácidos exerceram atividade antiinflamatória importante em ambos os testes sem evidências de efeitos irritantes. Os autores atribuíram o efeito antiinflamatório exercido pela mistura de ácidos graxos do óleo de cana aos efeitos inibitórios no metabolismo do ácido araquidônico.

Mendoza et al. (2001) compararam os efeitos de redução de colesterol do D-003 e do policosanol em coelhos normocolesterolêmicos. O D-003 administrado oralmente (5 mg/kg por 30 dias) nestes animais induziu maiores efeitos benéficos nos níveis séricos do colesterol LDL do que o policosanol nas mesmas doses.

Estudos toxicológicos prévios não demonstraram toxicidade oral relacionada ao D-003, e o risco potencial para a exposição oral ao D-003 é considerado baixo (GAMÉZ et al., 2000b, 2001, 2002a, 2002b, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Matéria-prima

A cera de cana-de-açúcar foi obtida por extração com hexano a partir de torta de filtro orgânica (cana cultivada em sistema orgânico com coleta mecânica sem queima), clarificada com peróxido de hidrogênio e purificada por extração com etanol a frio. A purificação e clarificação da cera de cana foram realizadas na Usina São Francisco (UFRA), localizada no município de Sertãozinho, São Paulo.

3.1.2. Reagentes, solventes e padrões

Foram utilizadas vidrarias de uso rotineiro em laboratórios de pesquisa e os reagentes utilizados nas análises químicas foram de grau p.a., de acordo com as especificações constantes nos métodos analíticos empregados. Abaixo são apresentados os principais reagentes e os padrões utilizados:

- ✓ Hidróxido de sódio (NaOH) – p.a.
- ✓ Álcool etílico - p.a.
- ✓ Cloreto de acetila - MERCK
- ✓ Padrão Lestanol[®] (Policosanol 99,5%) cedido por Garuda Internacional Inc., Lemon Cove, USA.
- ✓ Mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos 15A (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C20:0) – NU-CHEK.
- ✓ Mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (C16:0, C18:0, C20:0 e C22:0) – SIGMA.
- ✓ Eicosanol (C20:0 - OH), grau de pureza 98% - ALDRICH
- ✓ Ácido nonadecanóico (C19:0), grau de pureza 99,5% - FLUKA
- ✓ Octacosanol (C28:0 - OH), grau de pureza 99% - SIGMA
- ✓ Ácido octacosanóico (C28:0), grau de pureza 99% - SIGMA
- ✓ Ácido tetracosanóico (C24:0), grau de pureza 99% - FLUKA
- ✓ Ácido hexacosanóico (C26:0), grau de pureza 95% - SIGMA

3.1.3. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- ✓ Placa de aquecimento com agitação magnética IKA Werke, modelo RCT B;
- ✓ Estufa com circulação de ar NOVA ÉTICA, série 400D;
- ✓ Cromatógrafo Gasoso Capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM.
- ✓ Evaporador rotativo Fisatom, modelo 802 A;
- ✓ Bomba de vácuo Vacuubrand, modelo ME 30, tipo diafragma;
- ✓ Balança analítica OHAUS, Adventurer AR 2140;
- ✓ Balança semi-analítica Shimadzu, modelo Libror EB-3200D-A;
- ✓ Agitador de tubos Phoenix, modelo AP 56;
- ✓ Extrator tipo Butt Tecnal, modelo Sebelim TE-188;
- ✓ Banho termostático MGW Lauda, modelo RCS 20;
- ✓ Vidrarias de uso rotineiro em laboratório.

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização físico-química da cera clarificada e purificada

3.2.1.1. Ácidos Graxos Livres (AGL) e Índice de Acidez.

O teor de ácidos graxos livres (AGL) foi determinado de acordo com o método oficial AOCS Ca 5a-40 (2004), adaptado segundo Rozário (2006). O valor do índice de acidez foi obtido multiplicando-se a porcentagem de AGL pelo fator 1,99.

Na adaptação, 1,0 g de amostra foi previamente dissolvido à quente em tolueno (10mL). Em seguida a metodologia seguiu igual, com uso de 100 mL de álcool etílico neutralizado e titulação com solução padronizada de NaOH. O cálculo foi expresso em termos de ácido oléico.

3.2.1.2. Índice de saponificação

O índice de saponificação foi determinado de acordo com o método oficial AOCS Cd 3b-76 (2004), adaptado segundo Rozário (2006), com alteração da quantidade de amostra (0,5 g) e tempo de saponificação (8 horas).

3.2.1.3. Índice de iodo

O índice de iodo foi determinado de acordo com o método oficial AOCS Cd 1d-92 (2004), adaptado segundo Rozário (2006), onde 0,5 g de amostra foram dissolvidos previamente em ciclohexano à quente. Utilizaram-se 7,5 mL de ácido acético e 25 mL de solução de cloro-iodo segundo Wijs. A metodologia seguiu sem alteração para o cálculo.

3.2.1.4. Teor de matéria insaponificável

O teor de matéria insaponificável foi determinado de acordo com método oficial AOCS Ca 6b-53 (2001), adaptado segundo Rozário (2006), como descrito abaixo.

Cerca de 0,5 g de amostra foram dissolvidos em 10 mL de tolueno em banho aquecido e adicionados 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 capacidade de 500 mL, adicionando-se 50 mL de solução salina 10% e 50 mL de éter etílico. Após forte agitação, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos e em seguida a fase etérea foi separada. Ao final de 5 extrações, as fases etéreas foram lavadas 3 vezes com porções de 20 mL de solução salina e, em seguida, mais 3 vezes com porções de 20 mL de solução de KOH 0,5M, intercaladas com porções de água destilada. Após a terceira lavagem com KOH, a fração etérea foi lavada com água (aproximadamente 3 vezes) até teste negativo com fenolftaleína e transferida para um balão tarado. O solvente foi evaporado da fração em rotaevaporador. O

material foi seco em estufa a 105°C, até peso constante e o resíduo (A) foi dissolvido em 2 mL de éter etílico e 10 mL de álcool etílico 95%, previamente neutralizado e titulado, a quente, com NaOH 0,02 N, para correção dos ácidos graxos livres (B). Para esta correção foi utilizada a seguinte relação: 1 mL de NaOH 0,02 N foi equivalente a 0,0056 g de ácido oléico.

Foi realizado um branco (C), usando-se o mesmo procedimento. A matéria insaponificável (MI) foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$MI(\%) = \frac{A - (B + C)}{m} \times 100$$

onde:

A = massa do resíduo (g)

B = massa dos ácidos graxos (g) corrigida na titulação com NaOH

C = massa do resíduo do teste branco (g)

m = massa da amostra (g)

3.2.1.5. Ponto de fusão (Método do Tubo Capilar Fechado)

O ponto de fusão foi determinado de acordo com o método oficial AOCS Cc 1-25 (2004) e é definido como a temperatura que a amostra torna-se completamente clara e líquida.

3.2.1.6. Ponto de amolecimento (Método do Tubo Capilar Aberto)

O ponto de amolecimento foi determinado de acordo com o método oficial AOCS Cc 3-25 (2004) e é definido como a temperatura que a amostra torna-se suficientemente fluida para escorregar em um tubo capilar aberto.

3.2.1.7. Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método oficial AOCS AC 2-41 (2004), utilizando estufa com circulação de ar a 105 °C.

3.2.1.8. Teor e Composição em ácidos e álcoois graxos

Para a determinação da composição e dos teores de álcoois e ácidos graxos na cera de cana-de-açúcar foram testadas 3 metodologias de derivatização para posterior análise por cromatografia gasosa. As metodologias foram: Hartman e Lago (1973), Lepage e Roy (1986) e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

Em todas as metodologias testadas, o ácido nonadecanóico (C19:0) e o eicosanol (C20:0 – OH) foram utilizados como padrões internos, em concentrações próximas a 1 mg/mL.

Tanto os álcoois graxos como os ésteres metílicos de ácidos graxos, formados após derivatização das amostras, permaneceram retidos nas fases orgânicas. Por isso foi possível, mediante uma única injeção cromatográfica, determinar a composição e teor dos álcoois e ácidos graxos presentes nas amostras analisadas.

A composição em álcoois e ácidos graxos das amostras foi determinada utilizando a integração por normalização de áreas, através do software Agilent GC Chemstation Plus.

3.2.1.8.1 Derivatização das amostras de cera de cana-de-açúcar segundo metodologia descrita por Hartman e Lago (1973)

A amostra de cera e as frações obtidas nos processos de obtenção do concentrado de ácidos graxos foram submetidas à saponificação, seguida de esterificação com solução de cloreto de amônia, metanol e ácido sulfúrico, convertendo assim os ácidos graxos presentes nas amostras em ésteres metílicos de ácidos graxos. Foram realizados testes, em diferentes condições, com

alterações no tempo de saponificação, esterificação e o solvente de extração dos ésteres metílicos (éter de petróleo ou tolueno), conforme pode ser visto na Tabela 9. As reações ocorreram em temperatura de 90°C.

Tabela 9 - Condições dos testes de derivatização das amostras de cera segundo Hartman e Lago (1973)

	Tempo de Saponificação (min)	Tempo de Esterificação (min)
Teste A*	20	5
Teste B*	30	5
Teste C*	60	5
Teste D*	20	40
Teste E*	60	40
Teste F**	60	40

* Solvente de extração dos ésteres metílico: éter de petróleo

** Solvente de extração dos ésteres metílico: tolueno

3.2.1.8.2 Derivatização das amostras de cera de cana-de-açúcar segundo metodologia descrita por Lepage e Roy (1986)

As amostras foram submetidas a transesterificação direta dos ésteres de cera e posterior análise dos álcoois graxos e ésteres metílicos formados nesta reação. A metodologia sofreu algumas alterações conforme descrito a seguir: 50 mg de amostra foram pesadas em tubos de vidro juntamente com quantidades conhecidas dos padrões de ácido nonadecanóico e eicosanol. Em seguida foram adicionados 8 mL de álcool metílico e 2 mL de hexano (proporção 4:1). Após a mistura, foi adicionado lentamente 1 mL de cloreto de acetila com agitação constante. Os tubos foram fechados e submetidos a metanólise a 100°C por 1 hora. Depois os tubos foram esfriados e adicionados 25 mL de K₂CO₃ para interromper a reação e neutralizar a mistura. Os tubos foram então agitados e deixados em repouso por 5 minutos. A fase em hexano foi então analisada por cromatografia gasosa, como descrito no item 3.2.1.8.4.

3.2.1.8.3 Derivatização das amostras de cera de cana-de-açúcar segundo metodologia descrita por Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008)

As amostras foram submetidas a uma esterificação direta com solução metanólica de ácido sulfúrico 2%, onde os ácidos graxos livres presentes nas amostras analisadas foram convertidos diretamente em ésteres metílicos de ácidos graxos. Aproximadamente 30 mg de amostra foi pesada em tubo de ensaio de 10 mL com tampa. Em seguida foram adicionados 3 mL de clorofórmio e 1 mL de solução de padrão interno contendo os padrões eicosanol e ácido nonacosanóico em concentrações de 1 mg/mL cada, diluídos em clorofórmio. O tubo foi aquecido a 80°C por 15 minutos, com agitação ocasional. Após o resfriamento do tubo foi retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para outro tubo de ensaio. O conteúdo do tubo foi evaporado, em banho-maria, e em seguida foram adicionados 1 mL de solução de metilação ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{CH}_3\text{OH}$ - 2:98, v/v) e 1 mL de hexano. O tubo foi aquecido a 80°C por 15 minutos, com agitação ocasional. Foram adicionados 2 mL de solução de neutralização (NaOH 1M) e 1 mL de hexano e agitados lentamente por 3 minutos. O tubo foi deixado em repouso por 5 minutos e a fração em hexano analisada por cromatografia gasosa como descrito no item 3.2.1.8.4.

3.2.1.8.4 Condições cromatográficas para determinação da composição e teores dos álcoois e ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar

Os álcoois graxos e ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos nos processos de derivatização mencionados anteriormente foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa.

A separação dos componentes foi realizada em cromatógrafo gasoso (Agilent 6850 series – GC System) equipado com detector de ionização de chama (FID) e injetor com “split”, coluna capilar de sílica fundida ZB-5 (5% Fenil – 95% Dimetilpolisiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e

0,25 µm de espessura de filme. Foram injetadas amostras de 1,0 µL (split 1:50). Injetor e detector foram mantidos a 320°C, tendo hélio como gás de arraste, na vazão de 1,1 mL.min⁻¹.

A programação de temperatura na coluna foi de 180°C por 5 min, 180 a 300°C (4°C.min⁻¹) e 300°C por 25 min, totalizando 60 minutos.

Todas as determinações cromatográficas foram realizadas em duplicata

3.2.1.8.5 Identificação e quantificação dos álcoois e ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar derivatizados segundo metodologia de Hartman e Lago (1973) e Lepage e Roy (1986)

A identificação dos picos dos ácidos foi baseada nos valores de tempo de retenção obtidos a partir da injeção direta de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C22:0 – Sigma e Nu-Chek), e injeção de padrões de ácidos graxos (C24:0, C26:0 e C28:0 – Sigma e Fluka) e amostras de composição conhecida (óleo de mostarda) derivatizados segundo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973) (Teste A). Já a identificação dos álcoois foi realizada com base nos tempos de retenção de um padrão contendo álcoois graxos de 24 a 34 átomos de carbono (Lestanol[®] - Policosanol 99,5%). O óleo de mostarda e os padrões utilizados nesta análise foram injetados nas mesmas condições das amostras.

Para a quantificação dos álcoois e ácidos graxos, derivatizados segundo Hartman e Lago (1973), em 50 mg de amostra foram adicionados 1 mg de eicosanol (C20:0 – OH) e 1 mg de ácido nonadecanóico (C19:0) como padrões internos. O mesmo procedimento foi adotado para as amostras derivatizadas segundo Lepage e Roy (1986), onde quantidades conhecidas dos padrões internos foram pesadas diretamente nos tubos onde ocorreram as reações. As concentrações dos álcoois e ácidos graxos nas amostras foram calculadas com base na área do eicosanol e do ácido nonadecanóico considerando os fatores de resposta ao detector determinados como descrito no item 3.2.1.8.5.1.

3.2.1.8.5.1 Determinação dos fatores de resposta ao detector com derivatização dos padrões de álcoois e ácidos graxos.

Padrões de ácidos e álcoois graxos em diferentes concentrações foram injetados, ambos passando pelo processo de derivatização antes da análise cromatográfica, para a determinação dos fatores de resposta ao detector dos álcoois e ácidos graxos.

Foram injetadas diferentes concentrações conhecidas dos padrões do ácido octacosanóico (C28:0) e do octacosanol (C28:0) e concentrações conhecidas dos padrões internos eicosanol (C20:0) e ácido nonadecanóico (C19:0), conforme pode ser visualizado na Tabela 10. Todas as amostras foram derivatizadas segundo Hartman e Lago (1973), com alteração do tempo de saponificação para 20 minutos (Teste A).

Tabela 10 - Concentrações do ácido octacosanóico, octacosanol e padrões internos, utilizados na elaboração das curvas padrões dos ácidos e álcoois graxos.

Cromatogramas	Padrão interno C19:0 (mg/mL)	Padrão interno C20:0 (mg/mL)	Padrão Ácido Octacosanóico (mg/mL)	Padrão Octacosanol (mg/mL)
Amostra 1	1,07	1,27	0,26	0,25
Amostra 2	1,07	1,27	0,51	0,50
Amostra 3	1,07	1,27	0,72	0,74
Amostra 4	1,07	1,27	1,03	1,01

O fator de resposta para cada Amostra da Tabela 10 foi calculado mediante as seguintes fórmulas:

Fator de resposta para os álcoois graxos

$$f_{R(OH)} = \frac{\text{Área do Padrão Interno} \times \text{Concentração do Octacosanol}}{\text{Área do Octacosanol} \times \text{Concentração do Padrão Interno}}$$

Fator de resposta para os ácidos graxos

$$f_{R(Ac)} = \frac{\text{Área do Padrão Interno} \times \text{Concentração do Ácido Octacosanóico}}{\text{Área do Ácido Octacosanóico} \times \text{Concentração do Padrão Interno}}$$

Foi considerada nas fórmulas acima a média das áreas de 2 análises, para cada Amostra.

Os fatores de resposta ao detector para os álcoois e para os ácidos foram obtidos pela média aritmética dos fatores das 4 amostras.

3.2.1.8.6 Identificação e quantificação dos álcoois e ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar derivatizados segundo metodologia de Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008)

A identificação e integração dos picos dos ácidos e álcoois graxos presentes nas amostras foi realizada exatamente como descrito no item 3.2.1.8.5.

A massa (mg) de cada ácido e álcool graxo da amostra foi obtida pelo método do padrão interno de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Massa do ácido } i = \frac{\text{Área do ácido } i \times \text{Massa do Padrão Interno} \times f_i}{\text{Área do Padrão Interno}}$$

onde f_i é o fator de resposta do ácido ou álcool i de interesse.

Para a determinação de cada f_i , foi preparada uma solução de padrões (C24:0, C26:0, C28:0 e C28:0-OH) de concentração conhecida, derivatizados conforme descrito no item 3.2.1.8.3 e injetados nas mesmas condições cromatográficas já mencionadas. A equação utilizada para calcular cada fator de resposta foi a seguinte:

$$f_i = \frac{\text{Área do Padrão Interno} \times \text{Massa do Padrão } i}{\text{Área do Padrão } i \times \text{Massa do Padrão Interno}}$$

Os fatores de resposta para os ácidos e álcoois foram atribuídos da seguinte forma: ácidos C16:0 a C24:0 – mesmo fator do ácido C24:0; ácido C26:0 e C27:0 – mesmo fator do ácido C26:0; ácidos a partir do C28:0 – mesmo fator do ácido C28:0; todos os álcoois – mesmo fator do C28:0 álcool.

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Armazenamento da cera clarificada e purificada

A cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada fornecida pela usina São Francisco foi armazenada em sacos plásticos hermeticamente fechados e estocados em freezer na temperatura de -18°C até o momento da realização das análises e processos.

3.3.2. Caracterização da matéria-prima

A cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada foi caracterizada quanto aos seguintes parâmetros: ácidos graxos livres (AGL), índice de acidez, índice de saponificação, índice de iodo, teor de matéria insaponificável, ponto de fusão, ponto de amolecimento e teor de umidade. Também foram determinados o teor e a composição em ácidos e álcoois graxos.

3.3.3. Estudo do processo de produção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar em nível laboratorial

O estudo do processo de produção do concentrado de ácidos graxos de cadeia longa a partir de cera clarificada e purificada de cana-de-açúcar foi realizado com base no trabalho de Wada (2008). É importante ressaltar que os

produtos obtidos por Wada (2008), policosanol 50 e policosanol 90, são concentrados de álcoois graxos, obtidos de matéria-prima semelhante à utilizada neste trabalho, enquanto que nesta pesquisa, o material de interesse foi a fração de ácidos graxos presente na cera de cana.

Para tanto, utilizaram-se apenas 3 etapas:

Etapa 1 - Saponificação da cera

Etapa 2 - Separação dos álcoois e dos sais de ácidos graxos (sabões) utilizando álcool etílico a quente

Etapa 3 - Acidificação dos sais de ácidos graxos para obtenção do concentrado de ácidos graxos.

A Figura 3 ilustra as etapas gerais do processo de obtenção do concentrado de ácidos graxos utilizadas nesta pesquisa.

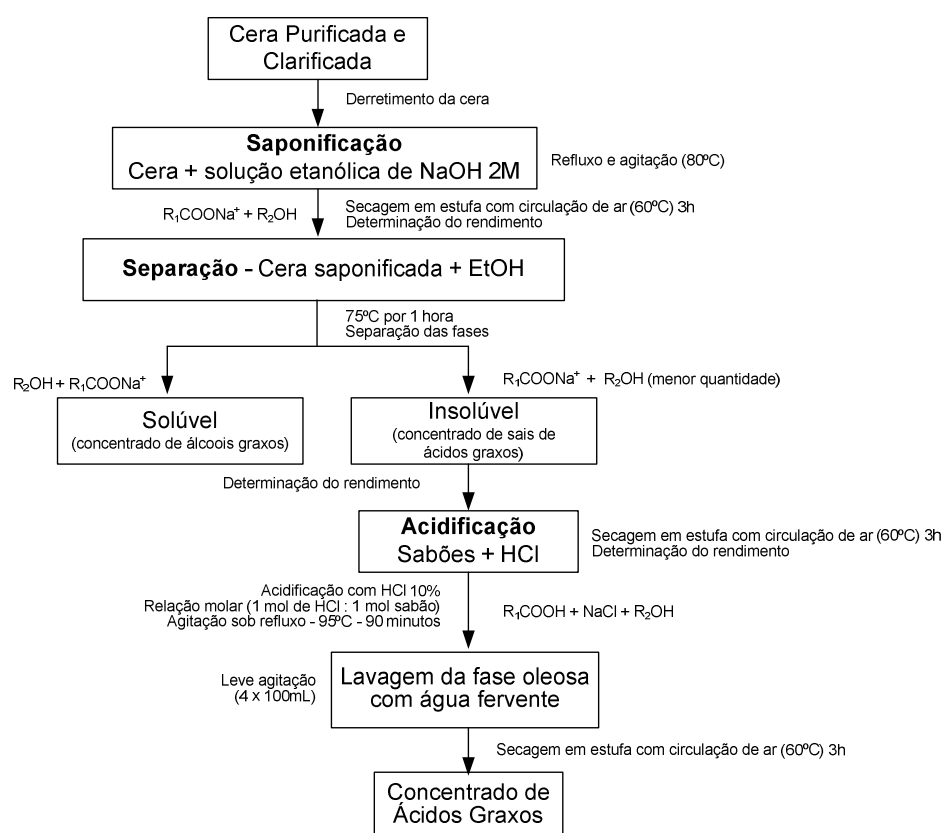


Figura 3 - Esquema geral do processo de obtenção dos ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada em nível laboratorial.

3.3.4. Descrição das etapas gerais para a obtenção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar em nível laboratorial

As principais etapas envolvidas no processo de obtenção do concentrado de ácidos graxos a partir da cera de cana-de-açúcar estão descritas a seguir.

3.3.4.1. Etapa 1 – Saponificação

A etapa de saponificação da cera de cana-de-açúcar teve como base o trabalho de Rozário (2006) que estudou um processo de obtenção do Policosanol (fração de álcoois graxos) a partir de cera bruta de cana-de-açúcar orgânica e cera purificada de cana-de-açúcar, obtida a partir da purificação da cera bruta utilizando álcool etílico a quente.

A cera foi saponificada utilizando solução alcalina hidro-alcoólica, em um sistema de balão de uma boca, adaptado a um condensador, o qual foi mantido em um banho de água termostatizado com agitação magnética. A temperatura da reação foi mantida constante (80°C). Após a fusão completa da cera, foi adicionada solução hidro-alcoólica (85% etanol anidro e 15% de água) 2M de NaOH obedecendo a relação de 1:1 (p/v) de cera:solução NaOH e a reação mantida por um determinado tempo, dependendo do ensaio realizado.

A cera saponificada foi seca em estufa por 3 horas a 60°C e seu rendimento determinado.

3.3.4.2. Etapa 2 – Separação das frações dos álcoois e dos ácidos graxos

Nesta etapa, adicionou-se álcool etílico anidro à cera saponificada. A mistura foi aquecida em banho de água termostatizado com agitação magnética até temperatura de 75°C. Após 10 minutos e total homogeneização da mistura, a agitação foi interrompida e o sistema permaneceu em repouso por 1 hora para a separação das fases. Passado esse período, as fases foram separadas por decantação. Para melhor entendimento, será atribuída a expressão fração solúvel

(solúvel em álcool etílico à quente) à fração rica em álcoois graxos e fração insolúvel (insolúvel em álcool etílico à quente) à fração rica em sais de ácidos graxos. Ao final, as fases separadas foram secas em estufa de circulação de ar (60°C por 3 horas) e o rendimento da etapa determinado.

3.3.4.3. Etapa 3 – Acidificação dos sais de ácidos graxos (sabões)

Nesta etapa, os sais de ácidos graxos (sabões) presentes na fração insolúvel foram convertidos em ácidos graxos livres através da reação de acidificação. Para isso foi utilizada a relação 1 mol de sabão para 1 mol de HCl (100%), com base no estudo feito por Scavariello e Barrera-Arellano (2004). Considerou-se que a massa de 1 mol de sabão é de aproximadamente 300g. Foi adicionado um excesso de 20% de HCl após o cálculo da quantidade necessária e o mesmo foi misturado à cera na forma de solução aquosa a 10%. O procedimento foi realizado da seguinte forma: a fração insolúvel foi pesada e colocada em um balão de fundo chato. Em seguida, adicionou-se a solução de ácido clorídrico a 10% e o balão foi acoplado a um condensador, mantido em um banho de óleo de silicone termostatizado, com agitação magnética, na temperatura de 95°C, por um período de 90 minutos. Ao término da reação, foi feita uma lavagem com 400 mL de água destilada fervente, até pH neutro (controle com fita indicadora de pH), para a remoção do cloreto de sódio (NaCl) formado durante a reação e do excesso de ácido presente no sistema. Na presença de água fervente a cera tornou-se líquida (aspecto oleoso) facilitando a remoção dos compostos anteriormente citados. A cada lavagem (4 lavagens de 100 mL) o conteúdo do balão era rapidamente resfriado e a água de lavagem filtrada à vácuo, para retenção de possíveis partículas de ácidos graxos dispersos nesta água. Ao final das lavagens, o resíduo do balão e do papel de filtro foi transferido para uma placa de petri de peso conhecido e seco em estufa de circulação de ar a 60°C por 3 horas. O produto obtido foi analisado quanto ao teor de álcoois e ácidos graxos e o rendimento da etapa determinado.

3.3.5. Ensaios laboratoriais para obtenção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar

Foram realizados ensaios com o objetivo de determinar as condições mais adequadas (separação das frações, tempo de reação, quantidade de solvente utilizado) para a obtenção do concentrado de ácidos graxos a partir da cera de cana-de-açúcar. Os itens a seguir descrevem as condições de realização das 3 etapas do processo, citadas anteriormente, para cada ensaio.

3.3.5.1. Ensaio 1: Separação das frações utilizando 3 extrações

No ensaio 1 a cera foi saponificada como descrito no item 3.3.4.1, com tempo de saponificação de 15 minutos. Foram realizadas 3 extrações com álcool etílico à quente para a separação dos álcoois e ácidos graxos. Na primeira extração utilizou-se a relação cera saponificada:álcool etílico de 1:3 (p/v). A mistura foi agitada e mantida em repouso por uma 1 hora. A seguir as frações foram separadas por decantação. Após a primeira extração, a fração insolúvel foi novamente extraída com álcool, desta vez em uma relação cera saponificada:álcool etílico (1:2 – p/v). Após mesmo procedimento de agitação e repouso por 1 hora, houve a separação das fases e o processo foi repetido por mais uma vez utilizando a mesma relação cera:álcool etílico anterior e repouso de 1 hora. A etapa de acidificação foi realizada como descrito no item 3.3.4.3.

3.3.5.2. Ensaio 2: Única extração para separação das frações

Neste ensaio, foi realizada uma única extração com etanol a quente, com relação cera saponificada:etanol (1:3 – p/v), na tentativa de separar melhor as duas frações. Não houve outras alterações em relação ao Ensaio 1.

3.3.5.3. Ensaio 3: Alteração na proporção de etanol:cera (extrações)

Neste ensaio, realizaram-se 3 extrações com etanol a quente, na etapa de separação dos álcoois e ácidos graxos. Na primeira extração utilizou-se uma relação cera saponificada:etanol de 1:5 (p/v) e nas outras duas, uma relação de 1:3 (p/v). Não houve outras alterações em relação ao Ensaio 1.

3.3.5.4. Ensaio 4: Alteração no tempo de saponificação

Durante a realização dos ensaios, os teores de ácidos e álcoois graxos de cada fração obtida foram determinados. Foram encontradas dificuldades para a quantificação dos teores de ácidos e álcoois e testadas várias metodologias. A hipótese de que o tempo de saponificação não foi suficiente para a conversão total dos ésteres de cera em álcoois e ácidos graxos de cadeia longa, foi sugerida. Para verificar tal hipótese, aumentou-se o tempo de saponificação de 15 minutos para 90 minutos. As etapas de separação e acidificação foram semelhantes ao Ensaio 1.

3.3.5.5. Ensaio 5: Alteração no tempo de saponificação, proporção de etanol:cera (extração) e utilização de funil de separação em estufa para separação das frações

Neste ensaio, foi mantido o tempo de saponificação de 90 minutos do Ensaio 4. A separação das frações solúvel e insolúvel em etanol a quente foi feita em uma única extração utilizando relação cera saponificada:etanol de 1:5 (p/v) em funil de separação, mantido a temperatura de 75°C dentro da estufa, conforme ilustrado na Figura 4. A etapa de acidificação foi realizada como descrito no item 3.3.4.3.



Figura 4 - Etapa de separação das frações de ácidos (inferior) e álcoois (superior) graxos, utilizando funil de separação em estufa com aquecimento. Ensaio 5.

Na Tabela 11 estão apresentadas, de forma resumida, as condições de realização dos 5 ensaios para obtenção do concentrado de ácidos graxos de cadeia longa em escala laboratorial.

Tabela 11 - Condições de realização dos ensaios para obtenção do concentrado de ácidos graxos de cadeia longa em escala laboratorial.

	Etapa de saponificação	Etapa de separação com EtOH à quente
Ensaio 1*	Cera : Solução NaOH 2M (1:1). Tempo: 15 min	3 extrações Relação cera:EtOH (1:3 – 1:2 – 1:2)
Ensaio 2*	Cera : Solução NaOH 2M (1:1). Tempo: 15 min	1 extração Relação cera:EtOH (1:3)
Ensaio 3*	Cera : Solução NaOH 2M (1:1). Tempo: 15 min	3 extrações Relação cera:EtOH (1:5 – 1:3 – 1:3)
Ensaio 4*	Cera : Solução NaOH 2M (1:1). Tempo: 90 min	3 extrações Relação cera:EtOH (1:3 – 1:2 – 1:2)
Ensaio 5*	Cera : Solução NaOH 2M (1:1). Tempo: 90 min	1 extração Relação cera:EtOH (1:5) Funil de separação em estufa a 75°C.

* Etapa de acidificação - Cera saponificada: HCl (1:1). Lavagem com água fervente (400 mL) até pH neutro. Filtração à vácuo.

3.3.6. Processo de produção do concentrado de ácidos graxos por destilação molecular

Concentrados de álcoois e ácidos graxos foram obtidos a partir da mesma matéria-prima utilizada nesta pesquisa (cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada) pela empresa Consultec, localizada na cidade de Campinas-SP. O processo de obtenção destes concentrados foi baseado na metodologia descrita por Rohr e Trujillo-Quijano (2000), com algumas alterações. As principais etapas do processo utilizado para obtenção destes concentrados estão ilustrados na Figura 5.

Partiu-se de 3 quilos de cera clarificada e purificada que foi saponificada com solução aquosa contendo hidróxido de cálcio (1,5%) e hidróxido de sódio (3%), por 90 minutos em temperatura de 80°C. A seguir, a massa foi seca (temperatura de 150°C) e destilada a 250°C sob vácuo de $2 \cdot 10^{-2}$ mbar. Obteve-se na fração destilada o concentrado de álcoois graxos, designado pela sigla CALGD. O resíduo da destilação foi hidrolisado com ácido sulfúrico a 6% (p/p – em relação a massa do resíduo) diluído em mesma quantidade de água destilada. A hidrólise deu-se por 30 minutos em temperatura de 90°C. Em seguida, a massa oleosa foi lavada com água fervente até pH neutro (aproximadamente 5 lavagens), seca e destilada nas mesmas condições citadas anteriormente. Na fração destilada foi obtido o concentrado de ácidos graxos, designado pela sigla CAGD, e no resíduo, provavelmente, concentraram-se os ésteres de cera que não foram convertidos em álcoois graxos e sais de ácidos graxos, entre outros compostos encontrados na cera.

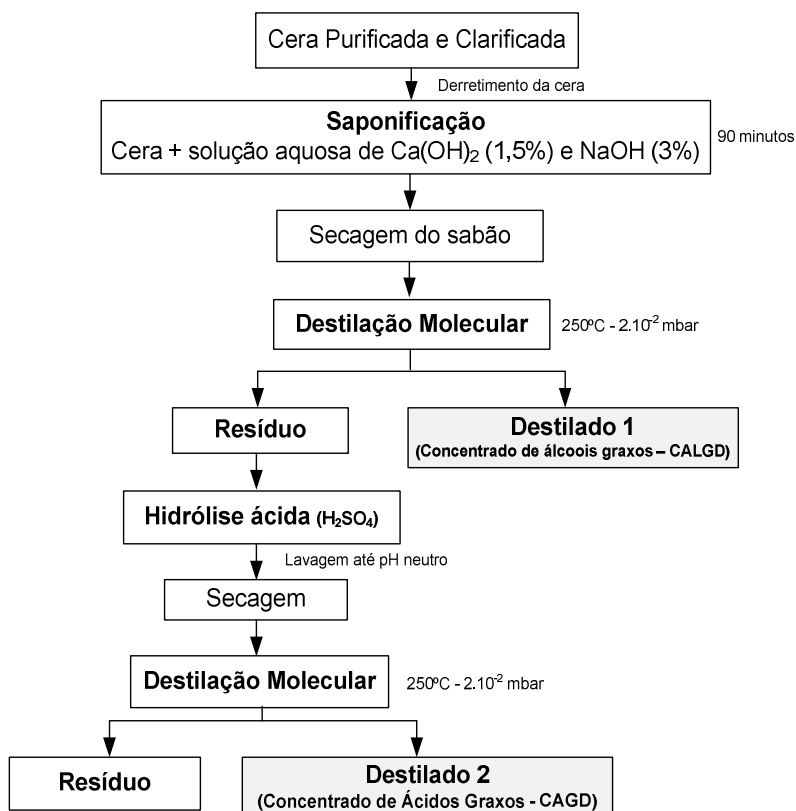


Figura 5 - Esquema geral do processo de obtenção dos concentrados de álcoois e ácidos graxos a partir da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, através de destilação molecular (ROHR;TRUJILLO-QUIJANO, 2000)

3.4. Determinação da composição e concentração em álcoois e ácidos graxos da cera de cana purificada e seus extratos

A seguir são descritas quais as amostras foram analisadas segundo as três técnicas de derivatização utilizadas nesta pesquisa.

3.4.1. Amostras de cera derivatizadas segundo metodologia descrita por Hartman e Lago (1973)

Foram realizados testes (A, B, C, D, E e F) com alterações na metodologia de Hartman e Lago (1973). No teste F também foi avaliado outro solvente de extração dos ésteres metílicos (tolueno no lugar de éter de petróleo). A Tabela 12 mostra quais as amostras foram utilizadas nos testes utilizando esta metodologia.

Tabela 12 - Amostras utilizadas nos testes, segundo metodologia de derivatização de Hartman e Lago (1973).

Amostras	Testes					
	Teste A	Teste B	Teste C	Teste D	Teste E	Teste F
Cera de cana purificada	X	X	X	X	X	X
Concentrado de ácidos graxos – Ensaio 1	X					
Concentrado de ácidos graxos – Ensaio 3						X
Concentrado de ácidos graxos (CAGD)					X	X
Concentrado de álcoois graxos (CALGD)					X	

Teste A (saponificação 20', esterificação 5'); Teste B (saponificação 30', esterificação 5'); Teste C (saponificação 60', esterificação 5'); Teste D (saponificação 20', esterificação 40'); Teste E (saponificação 60', esterificação 40'); Teste F (saponificação 60', esterificação 40' - utilizando tolueno como solvente de extração dos ésteres metílicos)

3.4.2. Amostras de cera derivatizadas segundo metodologia descrita por Lepage e Roy (1986).

As amostras utilizadas para a realização dos testes com a metodologia de derivatização descrita por Lepage e Roy (1986) foram: cera de cana-de-açúcar purificada, concentrado de ácidos graxos (Ensaio 1) e concentrado de ácidos graxos (CAGD).

3.4.3. Amostras de cera derivatizadas segundo metodologia descrita por Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

Foram utilizadas as seguintes amostras para a realização dos testes com a metodologia de derivatização descrita por Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008): cera de cana-de-açúcar purificada, concentrado de ácidos graxos (Ensaio 3, 4 e 5), concentrado de álcoois graxos (Ensaio 3, 4 e 5), concentrado de ácidos graxos (CAGD) e concentrado de álcoois graxos (CALGD).

3.5. Análise estatística

Os resultados das análises foram submetidos ao Teste de Tukey ao nível de significância de 5% para a comparação entre as médias, utilizando o Programa Estatístico Statistica[®] (Data Analysis Software System), versão 7.0 (StatSoft, Inc – 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características físico-químicas da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada

A Tabela 13 apresenta as características físico-químicas da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada.

Tabela 13 - Características físico-químicas da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada.

Análises	Média*	Desvio padrão
Ácidos graxos livres (AGL) (% como ácido oléico)	9,12	0,16
Índice de acidez (mg KOH/g)	18,14	0,32
Índice de saponificação (mg KOH/g)	141	0,10
Índice de iodo (mg I ₂ /100g)	20	0,14
Teor de matéria insaponificável (%)	34,7	0,30
Ponto de fusão (°C)	77,8	0,20
Ponto de amolecimento (°C)	74,9	0,45
Teor de umidade (%)	1,76	0,03

* cada valor é a média de 3 repetições.

A cera de cana-de-açúcar purificada apresenta características físico-químicas bem diferentes das ceras brutas, variando conforme o processo de purificação empregado. O índice de acidez (IA) determinado neste trabalho (18,14 mg KOH/g) foi inferior aos encontrados por outros autores que caracterizaram ceras brutas de cana orgânica, queimada e mista provenientes de torta de filtro (vide Tabela 6), variando de 27,3 a 52,4 mg KOH/g. Esta redução no valor do IA já era esperada devido ao processo de purificação da cera com etanol a frio, onde a fração oleosa que compõe a cera bruta é solubilizada no etanol e posteriormente eliminada, restando apenas ésteres de cera e resina (cera dura). Segundo Wada (2008), a fração oleosa é a responsável pelo aumento do índice de acidez, em relação à cera bruta, pela presença de ácidos graxos livres.

Dados da literatura reportam valores de IA para cera de cana purificada entre 13 e 39,6 mg KOH/g. O valor do IA encontrado neste estudo foi próximo ao obtido por Vieira (2003) em cera purificada com hexano e acetona (20,5 mg KOH/g). Gandra (2006), em estudo de cera purificada com etanol a frio, encontrou valores um pouco maiores de índice de acidez (23,2 mg KOH/g para cera purificada de cana orgânica e 22,7 mg KOH/g para cera purificada de cana mista). É importante observar que a cera purificada estudada por Gandra (2006) era composta apenas da fração de ésteres de cera, sem resina (fração dura). García e García (1996 apud GARCÍA et al., 2003) encontraram valores de IA de 27 mg KOH/g e Rozário (2006), 39,6 mg KOH/g em cera de cana purificada com etanol a quente. A cera purificada com álcool a quente apresenta a fração oleosa, o que explica o alto valor de acidez encontrado por Rozário (2006). Wada (2008) e Paixão (2008) caracterizaram cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, semelhante a utilizada neste trabalho, ou seja, composta da fração cera purificada e cera dura, e encontraram valores inferiores de IA (13,0 e 13,2 mg KOH/g, respectivamente). O IA encontrado neste estudo (18,14 mg KOH/g) foi superior aos determinados por Wada (2008) e Paixão (2008) devido à presença de um pouco de óleo de cana, ainda presente na amostra utilizada nesta pesquisa. Wada (2008) ressaltou em seu estudo, que o baixo valor de IA encontrado em seu trabalho foi devido à alta eficiência na extração da fração oleosa do processo de purificação da cera com etanol a frio.

O valor de índice de saponificação (IS) encontrado neste estudo (141 mg KOH/g), foi muito superior aos reportados na literatura para ceras de cana-de-açúcar purificada. O índice de saponificação está relacionado à quantidade de ésteres e ácidos graxos livres presentes na cera (PARISH; LI; BELL, 2007). Vieira (2003) e Gandra (2006) encontraram valores próximos de índice de saponificação para cera purificada (77,9 e 79,1 mg KOH/g, respectivamente). Wada (2008) e Paixão (2008) reportaram valores de Índice de saponificação de 96 mg KOH/g enquanto García e García (1996 apud GARCÍA et al., 2003) e Rozário (2006) encontraram valores um pouco maiores (106 e 118,3 mg KOH/g, respectivamente).

para este índice. O valor do índice de saponificação encontrado na cera de cana clarificada e purificada deste estudo é um indicativo de alto teor de ésteres, triacilgliceróis e ácidos graxos livres presentes nesta cera.

O resultado encontrado para o índice de iodo (20 mg de iodo/100g) foi semelhante aos encontrados por García e García (1996 apud GARCÍA et al., 2003), Gandra (2006), Wada (2008) e Paixão (2008). Os valores encontrados por estes autores variaram entre 21 e 22 mg de iodo/100g. Em outros estudos, realizados com cera de cana purificada com hexano e acetona (VIEIRA, 2003) e etanol a quente (ROZÁRIO, 2006), os valores foram bem diferentes. Vieira (2003) reportou um valor de índice de iodo (13 mg de iodo/100g) abaixo do encontrado neste estudo, enquanto Rozário (2006) reportou o dobro do valor do índice de iodo determinado neste trabalho e pelos autores citados acima. A autora atribui o aumento do índice de iodo da cera purificada ao processo de purificação com etanol à quente, que concentrou na fração solúvel a fração mais insaturada da cera. Já os processos de purificação da cera com etanol à frio e hexano, mostraram-se mais eficientes para a remoção da fração oleosa da cera bruta de cana – que apresenta um maior teor de ácidos graxos insaturados (GANDRA, 2006) –, fazendo com que o índice de iodo da cera purificada seja mais baixo em relação à cera bruta de origem.

O valor encontrado para o teor de matéria insaponificável da cera clarificada e purificada foi de 34,7%. Valores superiores a este foram reportados em cera purificada de cana orgânica. Vieira (2003) encontrou valor de 55,6%, Rozário (2006) de 50,8% e Wada (2008) e Paixão (2008) de 48,5%. Cardoso et al. (2009) caracterizaram cera de cana purificada com hexano e acetona e encontraram valores de 52,1% e 54,1% para cera de cana mista purificada de colheita tardia e precoce, respectivamente. O baixo valor de matéria insaponificável encontrado é coerente com o alto valor de índice de saponificação que esta matéria-prima apresentou, demonstrando a diferenciada composição desta cera em relação às outras reportadas anteriormente na literatura.

O ponto de fusão determinado (77,8°C) foi próximo ao encontrado por Gandra (2006) em cera de cana orgânica purificada (78,3°C). Valores maiores foram encontrados por Azzam (1984) em cera de cana purificada com acetona (80-83°C) e por Azzam (1986) em cera clarificada e purificada com etanol (79-82°C). Rozário (2006) reportou ponto de fusão de 70,2°C para cera purificada com etanol a quente e 71,6°C para cera bruta. Estes valores foram próximos, devido à presença da fração oleosa na cera purificada estudada pela autora, que reduz o ponto de fusão quando comparada às ceras onde houve remoção desta fração. Wada (2008) e Paixão (2008) encontraram valores de 75,0°C para o ponto de fusão da cera da cana clarificada e purificada.

O ponto de amolecimento encontrado para cera de cana clarificada e purificada foi de 74,9°C, inferior ao reportado por Gandra (2006) que encontrou valores de 77,8°C e 77,5°C para ceras de cana purificada orgânica e mista, respectivamente. Este é mais um indicativo da presença da fração oleosa que não foi completamente retirada da cera na etapa de purificação com etanol a frio.

O percentual de umidade da cera de cana purificada encontrado neste estudo foi de 1,76%, bem inferior ao reportado por Rozário (2006) em cera purificada (5,3%) e cera bruta (16,7%) de cana-de-açúcar. A autora atribuiu o alto valor de umidade encontrado nas amostras de cera à característica higroscópica do material, quando exposto ao ambiente. A cera utilizada neste estudo foi embalada hermeticamente e armazenada em freezer até o momento das análises, o que evitou qualquer degradação e absorção de umidade do ambiente.

As variações de resultados encontradas neste trabalho, quando comparadas aos dados da literatura, podem ser atribuídas à proporção dos constituintes presentes na amostra de cera estudada, à variedade da cana cultivada e ao processo de purificação industrial empregado.

4.2. Estudo do processo de produção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar em nível laboratorial

Foram realizados ensaios em escala laboratorial com algumas modificações em relação à descrição geral do método principal (item 3.3.3.), com o propósito de se encontrar as melhores condições de separação dos concentrados de álcoois e ácidos graxos da cera de cana. A seguir são apresentados os resultados dos rendimentos, em massa, para cada ensaio, todos calculados com base na massa de cera inicial.

4.2.1. Ensaio 1: Separação das frações utilizando 3 extrações

Neste ensaio obteve-se um rendimento, em massa, de cera saponificada igual a 106,0%. Na Figura 6 pode-se visualizar o aspecto da cera de cana clarificada e purificada e a cera após saponificação, seca em estufa com circulação de ar.



Figura 6 - Cera de cana clarificada e purificada e cera saponificada (Ensaio 1)

Foram realizadas 3 extrações à quente com álcool etílico anidro, com relação cera saponificada:etanol (1:3; 1:2; 1:2). Não houve boa separação das frações (solúvel e insolúvel em álcool a quente) conforme pode ser visto na Figura 7(a), devido à dificuldade de separação por decantação. Os rendimentos destas frações foram de 43,2% e 49,3%, respectivamente. O concentrado de ácidos graxos obtido após a acidificação da fração insolúvel apresentou rendimento de 40,9%.

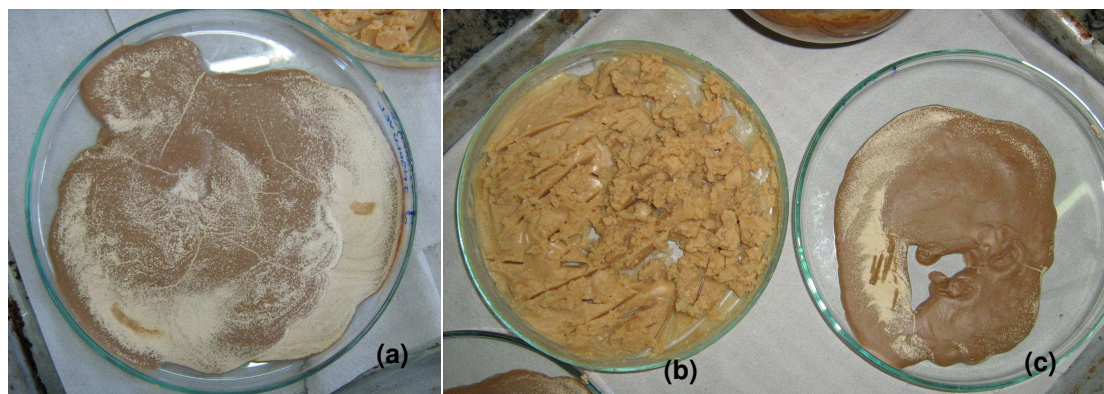


Figura 7 - (a) Contaminação da fração insolúvel (marrom) pela fração solúvel (pontos claros). Frações solúvel (b) e insolúvel (c) em álcool etílico quente (Ensaio 1)

4.2.2. Ensaio 2: Única extração para separação das frações

Utilizou-se neste ensaio apenas uma extração com etanol a quente (relação cera saponificada:etanol – 1:3, p/v). O rendimento de cera saponificada foi de 104,3% (em massa). Os problemas de separação das frações solúvel e insolúvel ainda permaneceram. O rendimento das frações solúvel (concentrado de álcoois graxos), insolúvel (sabões de ácidos graxos) e do concentrado de ácidos graxos foram, respectivamente, 36,0%, 53,2% e 42,3%. Analisando-se estes valores, percebe-se que houve uma maior contaminação da fração solúvel na fração insolúvel, com conseqüente aumento do rendimento das frações insolúvel e do concentrado de ácidos graxos. A Figura 8 ilustra o concentrado de ácidos graxos da cera de cana após secagem em estufa com circulação de ar.



Figura 8 - Concentrado de ácidos graxos da cera de cana (Ensaio 2)

4.2.3. Ensaio 3: Alteração na proporção de etanol:cera

O Ensaio 3 foi semelhante ao Ensaio 1, com alteração apenas da proporção cera saponificada:etanol. Aqui utilizou-se uma quantidade maior de etanol para a separação das frações (relação cera saponificada:etanol – 1:5; 1:3; 1:3). O rendimento da fração solúvel foi de 51,4% (o maior entre todos os ensaios) e o das frações insolúvel e concentrado de ácidos graxos, 45,7% e 38,0%, respectivamente (menores entre os demais ensaios). Este resultado indica uma provável contaminação da fração insolúvel na fração solúvel (concentrado de álcoois graxos). A Figura 9 mostra as frações solúveis resultantes das 3 extrações com etanol a quente. Observa-se a diferença de coloração entre estas frações, indicando a possível contaminação comentada anteriormente.



Figura 9 - Concentrado de álcoois graxos da cera de cana, resultantes das 3 extrações com álcool etílico a quente (Ensaio 3). Da esquerda para direita: extração 1, 2 e 3.

4.2.4. Ensaio 4: Alteração no tempo de saponificação

Os 3 ensaios anteriores utilizaram tempo de saponificação da cera de 15 minutos. Neste ensaio testou-se um tempo maior de saponificação, semelhante ao utilizado na obtenção do concentrado de ácidos graxos (CAGD) feito na Empresa Consultec. O objetivo deste ensaio foi verificar se o baixo rendimento dos teores de ácidos graxos encontrados nos concentrados de ácidos graxos obtidos em escala laboratorial foi devido à não transformação dos ésteres de cera em álcoois e ácidos graxos de cadeia longa na etapa de saponificação da cera. Os rendimentos obtidos foram os seguintes: cera saponificada - 105,3%; fração solúvel - 39,7%; fração insolúvel - 47,6% e concentrado de ácidos graxos - 40,0%.

A Figura 10 mostra os concentrados de álcoois e ácidos graxos obtidos no Ensaio 4 (amostras secas).

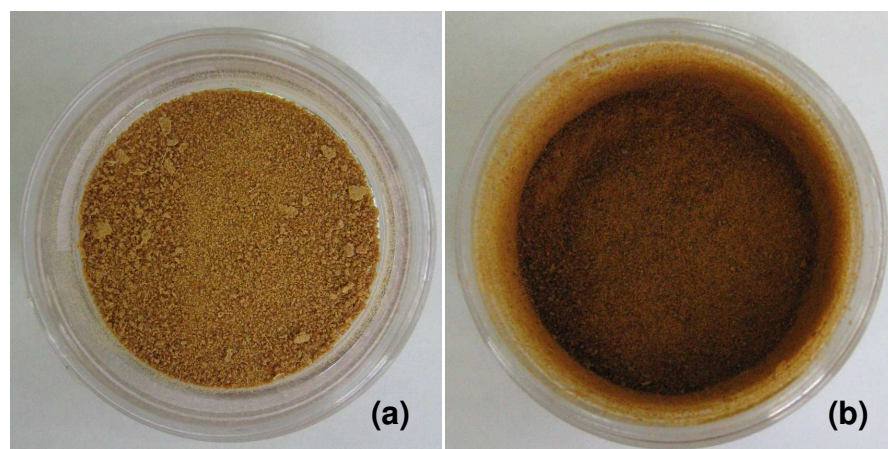


Figura 10 - Concentrado de álcoois graxos (a) e ácidos graxos (b) da cera de cana (Ensaio 4).

O aumento no tempo de saponificação não alterou os rendimentos dos concentrados

4.2.5. Ensaio 5: Alteração no tempo de saponificação, proporção de etanol:cera (extração) e utilização de funil de separação em estufa para separação das frações

Neste ensaio testou-se o uso de funil de separação (mantido a temperatura de 75°C dentro da estufa) para melhor separação das frações solúvel e insolúvel durante a etapa de extração com álcool etílico a quente (única extração). Manteve-se o mesmo tempo de saponificação do Ensaio 4 (90 minutos). Os rendimentos encontrados foram bem semelhantes aos obtidos no Ensaio 1, sendo de 106,6% para cera saponificada, 42,1% para fração solúvel, 48,3% para fração insolúvel e 40,4% para o concentrado de ácidos graxos.

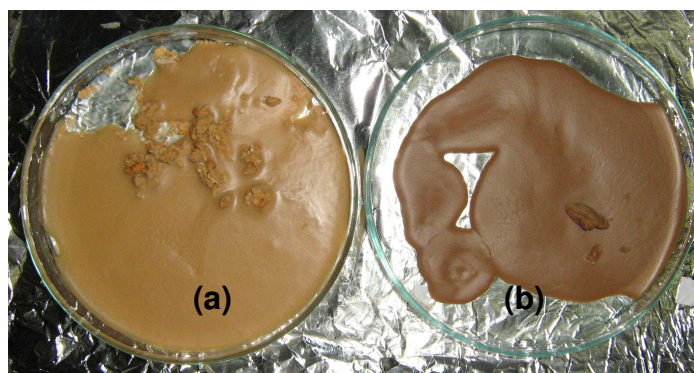


Figura 11 - Concentrado de álcoois graxos (a) e ácidos graxos (b) da cera de cana (frações com solvente - Ensaio 5).

A Tabela 14 mostra de forma simplificada todos os rendimentos dos ensaios realizados para obtenção dos concentrados de álcoois e de ácidos graxos.

Os rendimentos encontrados para o concentrado de ácidos graxos foram semelhantes, apresentado valor médio de $40,3 \pm 1,6\%$. Uma maior variação foi encontrada para os rendimentos do concentrado de álcoois graxos (fração solúvel), que ficou entre 36,0 e 51,4% e para os sais de ácidos graxos (fração insolúvel), entre 38,0 e 42,3%. Como pode ser observado na Figura 11, o Ensaio 5

apresentou boa separação, sem contaminação das frações na etapa de separação.

Tabela 14 - Rendimento dos ensaios para obtenção do concentrado de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
Cera saponificada*	106,0%	104,3%	105,0%	105,3%	106,6%
Concentrado de álcoois graxos (fração solúvel)**	43,2%	36,0%	51,4%	39,7%	42,1%
Sais de ácidos graxos – Sabões (fração insolúvel)**	49,3%	53,2%	45,7%	47,6%	48,3%
Concentrado de ácidos graxos*	40,9%	42,3%	38,0%	40,0%	40,4%

* Rendimento calculado com base na massa de cera purificada inicial

** Rendimento calculado com base na massa de cera saponificada

Ensaio 1 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 2 (saponificação 15', 1 extração – relação cera:EtOH - 1:3); Ensaio 3 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:5, 1:3, 1:3); Ensaio 4 (saponificação 90', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 5 (saponificação 90', 1 extração – relação cera:EtOH - 1:5)

Os rendimentos obtidos são semelhantes aos reportados por Wada (2008) que estudou um processo de obtenção de álcoois graxos à partir da cera de cana purificada, com extração dos álcoois utilizando etanol, obtendo rendimento de 38%, quando utilizou relação cera saponificada:etanol de 1:5 (única extração) em escala laboratorial e de 52,3% em escala piloto (relação cera saponificada:etanol – 1:7).

Rendimentos maiores foram reportados por Rozário (2006) em seu estudo de separação de álcoois graxos em cera de cana purificada, utilizando solução salina e etanol, e relação cera saponificada:etanol de 1:20, (p/v). Neste trabalho obteve-se rendimento de 55–60% com teor de álcoois de 45-50%.

Paixão (2008) obteve rendimentos de 16% para o concentrado de ácidos graxos e 80% para o concentrado de álcoois graxos, utilizando relação cera saponificada:etanol (1:10), em seu estudo de obtenção de concentrado de álcoois graxos a partir de cera de cana saponificada e acidulada, utilizando água quente e

etanol a frio na etapa de separação dos concentrados.

Devem ser consideradas as diferenças nos métodos utilizados por Rozário (2006) e Paixão (2008) que utilizaram solução salina e água quente nas etapas de separação da mistura de álcoois e sais de ácidos graxos, enquanto que neste estudo utilizou-se apenas separação com etanol a quente.

Os rendimentos do concentrado de ácidos graxos obtidos neste estudo (em média 40,3%) foram próximos aos alcançados no processo patenteado por González et al. (1997), que obteve rendimento máximo de 40%, com pureza na faixa de 85 a 100%, da mistura de ácidos graxos.

Os Ensaio 1, 2 e 3 foram os primeiros a serem realizados. Com base nos rendimentos e observações de coloração das frações, decidiu-se iniciar as análises cromatográficas dos teores de álcoois e ácidos graxos, apenas nas frações obtidas nos Ensaio 1 e 3, pois não houve boa separação das frações solúvel e insolúvel no Ensaio 2, obtendo-se um concentrado de ácidos graxos com maior contaminação da fração de álcoois. A separação no Ensaio 3 também não foi adequada, porém não prejudicou a fração de interesse, ou seja, neste ensaio procurou-se separar melhor as frações evitando-se ao máximo a contaminação da fração insolúvel (sais de ácidos graxos) com a fração solúvel (concentrado de álcoois graxos).

4.3. Processo de produção do concentrado de ácidos graxos por destilação molecular

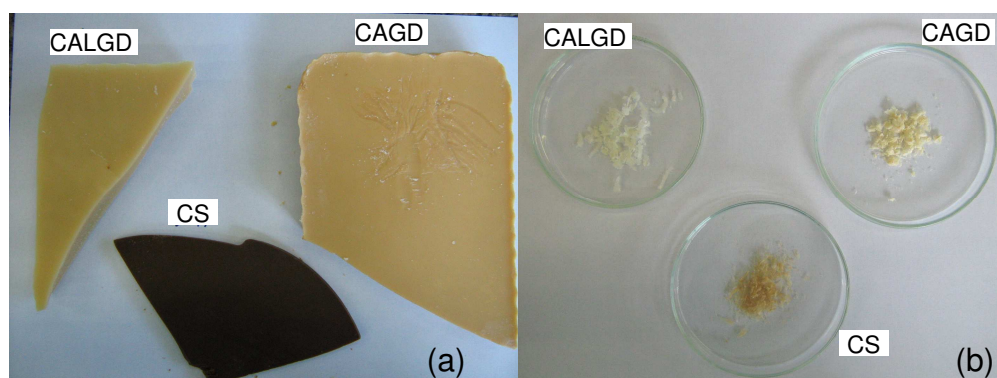
Os resultados dos rendimentos da produção do concentrado de ácidos graxos obtidos por destilação molecular estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Rendimento do processo de obtenção dos concentrados de álcoois e ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar, por destilação molecular.

	Rendimento (%)
Destilado 1 - Concentrado de álcoois graxos (CALGD)	27,7
Destilado 2 - Concentrado de ácidos graxos (CAGD)	23,4
Resíduo	48,9

Saponificação - 90 min à 80°C; Destilação - Vácuo 2.10^{-2} mbar à 250°C; Hidrólise ácida do resíduo – 30 min à 90°C

Foi realizado um único ensaio para obtenção dos concentrados de álcoois e ácidos graxos por destilação molecular, nas condições normalmente utilizadas pela empresa Consultec, porém em outros tipos de cera. O baixo rendimento obtido neste processo ocorreu, provavelmente, devido à pouca quantidade de hidróxidos utilizados na etapa de saponificação, etapa onde os ésteres de cera são convertidos em álcoois graxos e sais de ácidos graxos. Porém, o objetivo deste processo foi alcançado, onde foram obtidos os concentrados de álcoois e ácidos graxos com maior grau de pureza, para que fossem analisados utilizando as metodologias de derivatização estudadas nesta pesquisa. A Figura 12 mostra os concentrados obtidos neste processo.

**Figura 12** - Concentrado de álcoois graxos (CALGD), ácidos graxos (CAGD) e cera saponificada (CS) obtidos por destilação molecular. (a) Frações sólidas e (b) Frações em raspas.

4.4. Determinação dos fatores de resposta ao detector para o cálculo das concentrações em álcoois e ácidos graxos das amostras de cera de cana-de-açúcar.

Para se determinar os teores de álcoois e ácidos graxos presentes nas amostras de cera de cana clarificada e purificada e as frações obtidas no processo de obtenção dos concentrados foi utilizado o método do padrão interno. O álcool eicosanol (C20:0) e o ácido nonadecanóico (C19:0) foram utilizados como padrões internos nas análises cromatográficas realizadas por CG-FID. Para tanto, foi estudado se a resposta destes padrões ao detector (FID) era semelhante à resposta dos analitos em estudo.

4.4.1. Determinação dos fatores de resposta ao detector com derivatização dos padrões de álcoois e ácidos graxos segundo Hartman e Lago (1973)

Foram determinados os fatores de resposta ao detector para ácidos e álcoois injetando os padrões octacosanol (C28:0-OH) e ácido octacosanóico (C28:0) em quatro diferentes concentrações, juntamente com os padrões internos eicosanol (C20:0-OH) e ácido nonadecanóico (C19:0) em concentrações fixas, todos injetados ao mesmo tempo. Este procedimento foi realizado com a finalidade de representar exatamente o que ocorre com as amostras durante a etapa de derivatização, onde ambos os padrões internos (de álcoois e de ácidos) são derivatizados junto com as amostras.

Um modelo de regressão linear simples foi aplicado relacionando a razão entre as áreas do octacosanol (C28:0-OH) em diferentes concentrações e do padrão eicosanol (C20:0-OH) com a razão das concentrações do C28:0-OH e C20:0-OH. O mesmo modelo de regressão linear foi aplicado para os ácidos, conforme pode ser visto na Figura 13. Percebe-se que houve uma alta correlação linear ($R^2=0,9979$) entre as áreas do octacosanol (C28:0-OH) em diferentes

concentrações e o padrão interno eicosanol (C20:0), e entre as áreas do ácido octacosanóico (C28:0) e o padrão interno ácido nonadecanóico (C19:0) ($R^2=0,9991$).

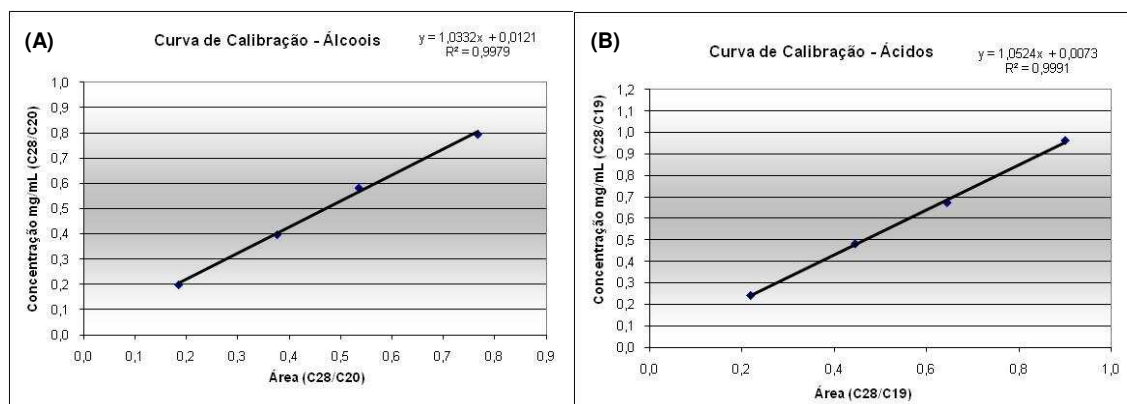


Figura 13 - Curvas de calibração do octacosanol (A) e do ácido octacosanóico (B) utilizadas para a determinação dos teores de álcoois e ácidos graxos nas amostras de cera de cana.

A Figura 14 apresenta os cromatogramas obtidos através da injeção das amostras com concentrações conhecidas dos padrões internos, do octacosanol e do ácido octacosanóico. Os picos dos padrões internos mantiveram-se semelhantes entre uma amostra e outra, já que todas estavam na mesma concentração. Os picos do octacosanol e do ácido octacosanóico aumentaram proporcionalmente à medida que suas concentrações também aumentavam. Todos os cromatogramas estão apresentados na mesma escala.

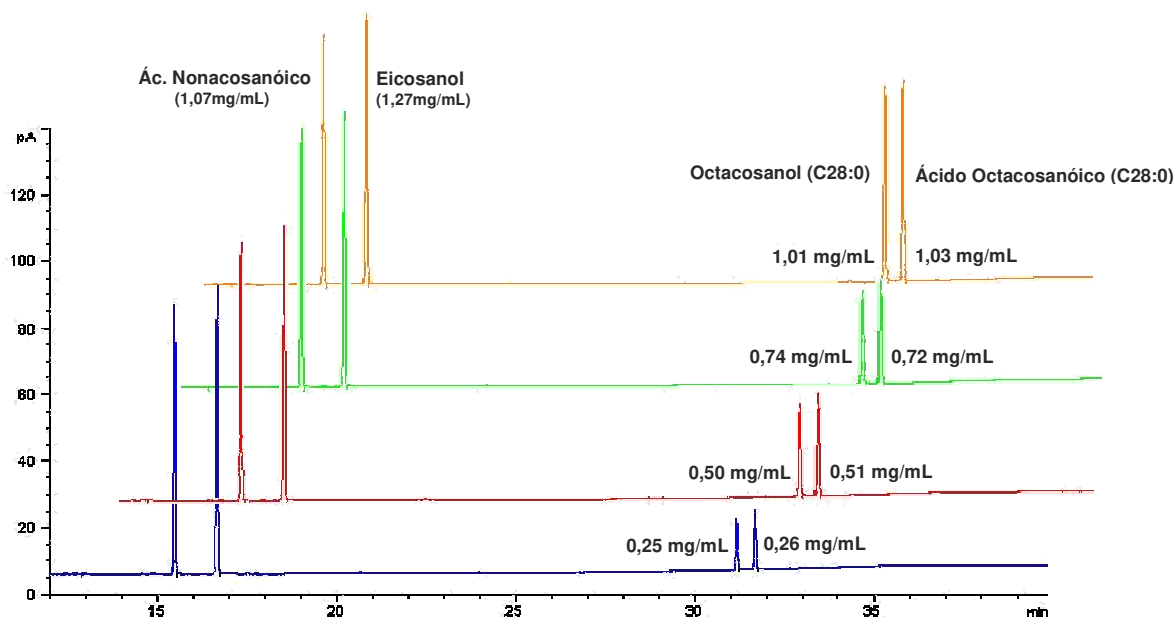


Figura 14 - Cromatogramas para cálculo dos fatores de resposta ao detector, dos álcoois e ácidos graxos.

O fator de resposta obtido para os álcoois graxos foi de **1,063** e para os ácidos **1,071**. Estes fatores foram utilizados para corrigir as áreas dos padrões internos na determinação dos teores totais de álcoois e ácidos graxos presentes nas amostras de cera, quando determinadas pelos métodos de Hartman e Lago (1973) e Lepage e Roy (1986). Considerou-se que todos os álcoois graxos presentes nas amostras apresentaram o mesmo fator de resposta ao detector que o octacosanol e os ácidos graxos, mesmo fator de resposta que o ácido octacosanóico. Para a quantificação dos compostos não identificados, utilizou-se o mesmo fator de correção dos álcoois graxos (1,063).

4.4.2. Determinação dos fatores de resposta ao detector com derivatização dos padrões de álcoois e ácidos graxos segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008)

Padrões de ácidos graxos (C24:0, C26:0 e C28:0) e álcool graxo (C28:0–OH) foram derivatizados segundo metodologia descrita por Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008) para a determinação dos teores de álcoois e ácidos graxos presentes nas amostras de cera derivatizadas segundo mesma metodologia. Os fatores encontrados estão na Tabela 16.

Tabela 16 - Fatores de resposta dos padrões de ácidos e álcoois graxos derivatizados segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

Padrões	Fatores de resposta
C24:0 – Ácido Tetracosanóico	1,119
C26:0 – Ácido Hexacosanóico	1,186
C28:0 – Ácido Octacosanóico	1,598
C28:0 – Octacosanol	0,965

Para a quantificação dos compostos não identificados, utilizou-se o mesmo fator de correção dos álcoois graxos (0,965).

4.5. Composição e concentração de ácidos e álcoois graxos nas amostras de cera derivatizadas segundo Hartman e Lago (1973)

A Figura 15 apresenta um cromatograma da composição em ácidos e álcoois graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada utilizando-se a metodologia de Hartman e Lago (1973) para derivatização da amostra, com tempo de saponificação de 20 minutos e esterificação de 5 minutos (Teste A). Os álcoois estão representados por letras e os ácidos por números.

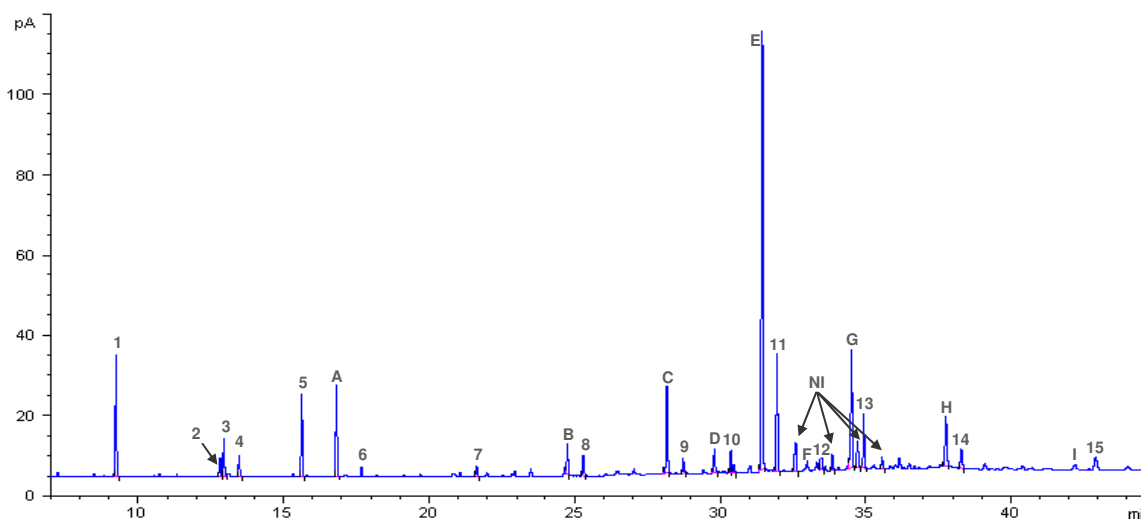


Figura 15 - Cromatograma de ácidos e álcoois graxos da cera de cana clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste A. 1:ácido palmítico (C16:0); 2: ácido linolênico(C18:3); 3: ácido oléico e linoléico (C18:1 e C18:2); 4: ácido esteárico (C18:0); 5: ácido nonacosanóico (C19:0); 6: ácido eicosanóico (C20:0); 7: ácido docosanóico (C22:0); 8: ácido tetracosanóico (24:0); 9: ácido hexacosanóico (C26:0); 10: ácido heptacosanóico (C27:0); 11: ácido octacosanóico (C28:0); 12: ácido nonacosanóico (C29:0); 13: ácido triacontanóico (C30:0); 14: ácido dotriacontanóico (C32:0); 15: ácido tetratriacontanóico (C34:0); A: eicosanol (C20:0); B: tetracosanol (C24:0); C: hexacosanol (C26:0); D: heptacosanol (C27:0); E: octacosanol (C28:0); F: nonacosanol (C29:0); G: triacontanol (C30:0); H: dotriacontanol (C32:0); I: tetratriacontanol (C34:0); NI: não identificados.

Gandra (2006) modificou o tempo de saponificação da metodologia de Hartman e Lago (1973) para 20 minutos, e utilizou-a para determinação da composição em álcoois e ácidos graxos de amostras de cera de cana purificada. Paixão (2008) e Wada (2008) realizaram esta mesma modificação feita por Gandra (2006) para quantificar álcoois graxos em cera de cana purificada. Devido à simplicidade do método, utilizou-se esta metodologia na tentativa de quantificar também os ácidos graxos de cadeia longa presentes na cera.

Conforme pode ser observado na Figura 15, álcoois e ésteres metílicos de ácidos graxos são eluídos na coluna cromatográfica, podendo ser identificados simultaneamente. Porém a quantidade de álcoois (indicados por letras) presente na amostra é bem maior do que a quantidade esperada de ácidos. Baseado nas pesquisas de Wada (2008) e Paixão (2008), que estudaram o processo de

obtenção de concentrado de álcoois graxos a partir de cera clarificada e purificada, semelhante à utilizada nesta pesquisa, esperava-se um teor de ácidos graxos totais em torno de 33%, próximo ao teor encontrado pelas autoras para álcoois graxos totais (30,5%), tendo em vista a quantidade de matéria insaponificável encontrada pelas mesmas (48,5%). Sabe-se que a matéria insaponificável na cera é composta principalmente por álcoois graxos livres e esterificados e esteróis. Logo, foram feitas modificações nos tempos de saponificação e esterificação das amostras, como também no solvente de extração dos ésteres metílicos, com a finalidade de encontrar teores maiores de ácidos graxos totais nas amostras de cera de cana purificada.

As Tabelas 17 e 18 apresentam a composição em ácidos e álcoois graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada em diferentes condições (Testes A, B, C, D, E e F) como descrito no item 3.2.1.8.1. As proporções relativas dos ácidos graxos oléico e linoléico apresentam-se somadas, uma vez que a coluna cromatográfica utilizada não separa estes dois ácidos graxos.

Os principais ácidos graxos encontrados foram o ácido palmítico (C16:0), octacosanóico (C28:0) e triacontanóico (C30:0). Estes mesmos ácidos também foram os majoritários, segundo Gandra (2006), Wada (2008) e Paixão (2008).

Os ácidos graxos saturados predominaram na cera de cana clarificada e purificada, apresentando teores entre 89,6% e 94,6%, onde 63,2 a 69,5% do total de ácidos é formado por ácidos graxos de cadeia muito longa (C22:0 – C34:0).

Em relação à composição do ácido octacosanóico (C28:0), não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os Testes de A a D e os maiores teores foram encontrados nos Testes E e F (que utilizaram maior tempo de saponificação e esterificação), sendo diferentes significativamente ($p < 0,05$) em relação ao Teste A (menores tempos de saponificação e esterificação). O ácido triacontanóico (C30:0) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas no Teste D, onde este apresentou o menor teor (8,0%).

De acordo com a Tabela 17, não houve grandes alterações nos teores relativos dos ácidos palmítico, oléico e linoléico em relação às modificações feitas na metodologia de Hartman e Lago (1973), com exceção apenas para o teor de ácido palmítico no Teste F (extração com tolueno) que foi o menor entre todos (18,5%).

O ácido linolênico (C18:3) não foi detectado nos Testes B, C e E e entre os demais Testes (A, D e F) não apresentou diferença significativa a 5% de significância.

Tabela 17 - Composição em ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de Hartman e Lago (1973), em diferentes condições (Teste A, B, C, D, E e F).

Ácidos graxos	Composição* (%)					
	Teste A	Teste B	Teste C	Teste D	Teste E	Teste F
16:0 - Palmítico	22,5 ^{ab}	22,6 ^{ab}	22,7 ^a	22,7 ^a	21,6 ^b	18,5 ^c
18:3 - Linolênico	3,3 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	2,2 ^a	0,0 ^b	2,4 ^a
18:1 e 18:2 – Oléico e Linoléico	7,1 ^a	5,4 ^b	5,5 ^b	6,2 ^{ab}	4,8 ^b	5,9 ^b
18:0 - Esteárico	3,9 ^{ab}	3,9 ^a	4,0 ^{ab}	4,2 ^b	4,0 ^{ab}	4,0 ^{ab}
20:0 - Araquídico	1,6 ^a	1,7 ^{ab}	1,7 ^{ab}	1,9 ^b	1,8 ^b	1,7 ^{ab}
22:0 - Docosanóico	2,1 ^a	2,1 ^a	2,2 ^a	2,4 ^a	2,4 ^a	2,3 ^a
24:0 - Tetracosanóico	4,1 ^a	4,3 ^{ab}	4,3 ^{ab}	4,7 ^{bc}	4,8 ^c	4,9 ^c
26:0 - Hexacosanóico	2,9 ^a	3,1 ^a	3,2 ^{ab}	3,3 ^{ab}	3,2 ^{ab}	3,6 ^b
27:0 - Heptacosanóico	4,9 ^{ac}	5,1 ^a	5,1 ^a	4,2 ^b	3,9 ^b	4,8 ^c
28:0 - Octacosanóico	24,8^a	26,5^{ab}	26,0^{ab}	25,7^{ab}	26,8^b	27,1^b
29:0 - Nonacosanóico	2,0 ^a	2,5 ^a	3,2 ^a	3,4 ^a	2,4 ^a	2,6 ^a
30:0 - Triacontanóico	10,1 ^{ab}	11,1 ^a	10,7 ^a	8,0 ^b	11,7 ^a	12,5 ^a
32:0 - Dotriacontanóico	5,4 ^a	6,2 ^{bc}	5,9 ^b	5,9 ^{ab}	6,5 ^{cd}	6,9 ^d
34:0 - Tetratriacontanóico	5,3 ^a	5,5 ^{ab}	5,3 ^a	5,3 ^a	6,0 ^b	2,9 ^c
Saturados	89,6 ^a	94,6 ^b	94,5 ^b	91,6 ^a	95,2 ^b	91,7 ^a
Insaturados	10,4 ^a	5,4 ^b	5,5 ^b	8,4 ^a	4,8 ^b	8,3 ^a

Teste A (saponificação 20', esterificação 5'); Teste B (saponificação 30', esterificação 5'); Teste C (saponificação 60', esterificação 5'); Teste D (saponificação 20', esterificação 40'); Teste E (saponificação 60', esterificação 40'); Teste F (saponificação 60', esterificação 40' - utilizando tolueno como solvente de extração dos ésteres metílicos)

*Média das análises. Médias na mesma linha acompanhadas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância

Comparando-se a composição em ácidos graxos obtida nas condições do Teste A – condições propostas por Gandra (2006) – com a composição encontrada por outros autores (vide Tabela A.1 – Apêndice) que estudaram cera de cana purificada, derivatizada nas mesmas condições do Teste A, pode-se observar que as quantidades dos ácidos C16:0, C18:3, C18:1, C18:2 e C30:0 foram inferiores aos encontrados por Wada (2008), Paixão (2008) e Gandra (2006). No entanto, as quantidades dos ácidos C28:0 e C32:0 foram maiores quando comparadas às mesmas autoras.

A Tabela 18 apresenta a composição em álcoois graxos da cera (proporção relativa dos álcoois graxos), nos diferentes testes realizados. O álcool graxo majoritário, em todos os testes, foi o octacosanol, apresentando teores entre 55,9% e 58,5% do total dos álcoois graxos presentes.

Tabela 18 - Composição em álcoois graxos da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de Hartman e Lago (1973), em diferentes condições (Teste A, B, C, D, E e F).

Álcoois graxos	Composição* (%)					
	Teste A	Teste B	Teste C	Teste D	Teste E	Teste F
C24:0 - Tetracosanol	3,2 ^a	3,9 ^b	4,4 ^b	4,0 ^b	3,9 ^b	4,3 ^b
C26:0 - Hexacosanol	10,4 ^a	10,3 ^{ab}	10,4 ^a	10,2 ^b	9,9 ^{bc}	9,9 ^c
C27:0 - Heptacosanol	2,7 ^a	2,6 ^a	2,7 ^a	2,6 ^a	2,5 ^a	2,7 ^a
C28:0 - Octacosanol	58,5 ^a	58,4 ^a	58,0 ^b	58,0 ^b	57,5 ^c	55,9 ^d
C29:0 - Nonacosanol	0,8 ^a	1,0 ^{ab}	1,1 ^b	1,0 ^b	1,0 ^b	1,5 ^c
C30:0 - Triacontanol	15,6 ^a	15,2 ^{ab}	15,1 ^{ab}	15,3 ^{ab}	16,0 ^a	14,4 ^b
C32:0 - Dotriacontanol	7,6 ^{ab}	7,5 ^b	7,3 ^b	7,8 ^{ac}	7,8 ^{ac}	7,9 ^c
C34:0 - Tetratriacontanol	1,0 ^a	1,1 ^a	1,0 ^a	1,1 ^a	1,2 ^a	3,5 ^b

Teste A (saponificação 20', esterificação 5'); Teste B (saponificação 30', esterificação 5'); Teste C (saponificação 60', esterificação 5'); Teste D (saponificação 20', esterificação 40'); Teste E (saponificação 60', esterificação 40'); Teste F (saponificação 60', esterificação 40' - utilizando tolueno como solvente de extração dos ésteres metílicos)

*Média das análises. Médias na mesma linha acompanhadas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância

A composição em álcoois graxos mostrou resultados similares entre os testes realizados, com valores um pouco diferentes para os Testes E e F, que utilizaram os maiores tempos de saponificação e esterificação. Essas diferenças foram observadas nos álcoois octacosanol (C28:0) e triacontanol (C30:0) (menores teores), nonacontanol (C29:0) e tetratriacontanol (C34:0) (maiores teores).

A Tabela A.2 do Apêndice, apresenta uma comparação da composição em álcoois graxos da cera de cana purificada encontrada por diferentes autores. A quantidade relativa de octacosanol encontrada neste estudo, nas condições do Teste A (58,5%), foi menor em relação às concentrações reportadas por Gandra (2006), Wada (2008) e Paixão (2008), que utilizaram mesma metodologia de derivatização do Teste A, encontrando teores de octacosanol (C28:0) entre 62,8%, e 64,6%. Vieira (2003) e Rozário (2006), utilizando reagente de Grignard para derivatização das amostras de cera purificada, encontraram teores de octacosanol de 67,3% (cera purificada com hexano/acetona) e 59,3% (cera purificada com álcool etílico), respectivamente. O álcool tetratriacontanol (C34:0) não foi detectado em quantidade significativa pelos autores acima citados.

As variações na composição dos ácidos e álcoois graxos da cera purificada podem ser atribuídas ao método de análise, ao tratamento aplicado na purificação, variedade da cana, entre outros fatores.

Na Tabela 19 são apresentados as concentrações de álcoois e ácidos graxos totais da cera de cana clarificada e purificada derivatizada pelo método de Hartman e Lago (1973) em diferentes condições.

Tabela 19 - Concentração de álcoois e ácidos graxos totais da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de Hartman e Lago (1973), em diferentes condições (Teste A, B, C, D, E e F).

Método	Concentração* (%)		
	Álcoois	Ácidos	Não Identificados
Teste A	24,6 ^a	13,0 ^a	3,1 ^a
Teste B	26,5 ^b	13,3 ^a	4,1 ^{bc}
Teste C	25,6 ^{ab}	12,8 ^a	3,7 ^{ab}
Teste D	28,5 ^c	15,5 ^b	4,4 ^{cd}
Teste E	31,6 ^d	16,6 ^b	4,8 ^d
Teste F	33,4 ^d	16,9 ^b	4,3 ^{bcd}

Teste A (saponificação 20', esterificação 5'); Teste B (saponificação 30', esterificação 5'); Teste C (saponificação 60', esterificação 5'); Teste D (saponificação 20', esterificação 40'); Teste E (saponificação 60', esterificação 40'); Teste F (saponificação 60', esterificação 40' - utilizando tolueno como solvente de extração dos ésteres metílicos)

*Média das análises. Médias na mesma coluna acompanhadas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância

Foram encontrados valores entre 24,6% e 33,4% de álcoois graxos totais e entre 12,8% e 16,9% de ácidos graxos totais na cera de cana. Esses valores comprovam que existe diferença significativa quanto se varia o tempo de esterificação. Os Testes A, B e C apresentaram valores próximos para o teor de álcoois e sem diferença significativa ($p < 0,05$) para o teor de ácidos. Estes testes foram realizados utilizando tempo de esterificação de 5 minutos, como descrito originalmente na metodologia de Hartman e Lago (1973). Comparando-se o teste A e D, que utilizaram o mesmo tempo de saponificação e tempo de esterificação diferente, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) tanto para os álcoois como para os ácidos. Com o aumento do tempo de saponificação e esterificação (Testes D, E e F), houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos teores de álcoois e ácidos. Comparando-se o Teste A e o Teste F, percebe-se uma diferença de 8,8% no teor total de álcoois e de 3,9% no teor total de ácidos. Em relação ao solvente de extração dos ésteres metílicos (éter de petróleo ou tolueno), observou-se um pequeno aumento para o Teste F que utilizou solvente tolueno. Porém, este aumento não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao Teste E que utilizou éter de petróleo, assim como os demais Testes. Logo, optou-se pela

continuação do uso do solvente éter de petróleo nas análises seguintes, por se tratar de um solvente menos tóxico que o tolueno.

Após análise destes resultados, conclui-se que as condições do Teste E foram as que resultaram em maiores teores de álcoois e ácidos graxos da cera de cana, utilizando a metodologia de Hartman e Lago (1973), e portanto, utilizada na análise das demais frações obtidas neste estudo.

Wada (2008) e Paixão (2008) encontraram valores de 30,5% de álcoois graxos totais para cera de cana clarificada e purificada (derivatização nas mesmas condições do Teste A). Vieira (2003), Gandra (2006) e Rozário (2006), determinaram a concentração de álcoois graxos da cera de cana purificada pelo método de Grignard – segundo Pina et al. (1997) adaptado por Vieira (2003) – e encontraram teores de 28,3%, 39,1% e 29,9%, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos encontrados neste estudo, com exceção dos valores encontrados por Gandra (2006), que foram maiores.

García e García (1996 apud GARCÍA et al., 2003), encontraram teores de 42% de álcoois graxos e 7,1% de ácidos graxos livres, em cera de cana purificada com etanol. Estes autores quantificaram os ácidos graxos livres por transesterificação da amostra com solução de MeONa/MeOH a 1% em temperatura de 85-90°C. Os teores de ácidos graxos livres encontrados por estes autores foram bem inferiores (metade) aos teores de ácidos encontrados na cera de cana purificada utilizada nesta pesquisa.

Nuissier et al. (2002) estudaram a composição da cera extraída do resíduo da fermentação e destilação do caldo de cana, utilizando solvente ciclohexano. A fração de cera insolúvel em metanol, acetona e isooctano foi saponificada e submetida a análise de CCD analítica para quantificação dos seus componentes. Esta fração apresentou teor de álcoois graxos totais de 32%, tendo o octacosanol como álcool graxo principal (68%) e teor de ácidos graxos totais de 28%, sendo 42% deste total composto de ácido palmítico (C16:0), 9% de ácido oléico (C18:1) e os ácidos esteárico (C18:0), linoléico (C18:2) e octacosanóico (C28:0)

contribuíram com 7% cada. Os mesmos autores também quantificaram os teores totais de alcanos (7%) e 33% dos compostos não foram identificados. Os teores de álcoois graxos totais encontrados por estes autores foram próximos aos determinados nos Testes E e F nas amostras de cera de cana clarificada e purificada.

4.6. Determinação comparativa da composição e concentração de álcoois e ácidos graxos em cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada e concentrados, derivatizada por diferentes métodos

As amostras de cera clarificada e purificada e as frações obtidas nos ensaios para obtenção do concentrado de ácidos graxos foram analisadas em relação à composição e concentração de álcoois e ácidos graxos utilizando 3 metodologias de derivatização. Após avaliar as amostras de cera pelo método de Hartman e Lago (1973), em diferentes condições, como já visto no item 4.5, resolveu-se testar outras metodologias na tentativa de verificar os dados e métodos relatados na literatura. A Tabela 20 mostra, de forma comparativa, a composição da cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada derivatizada por diferentes metodologias. Os cromatogramas destas análises estão no Apêndice (Figura A.1).

Tabela 20 - Composição em ácidos e álcoois graxos da **cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada**, derivatizada segundo Hartman e Lago (1973), Lepage e Roy (1986) e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

Componente	Composição (%)					
	Ácidos			Álcoois		
	H&L*	L&R	MMC	H&L*	L&R	MMC
C16:0	21,6	19,1	14,3	-	-	-
C18:3	0,0	8,9	1,2	-	-	-
C18:1 e C18:2	4,8	10,3	3,5	-	-	-
C18:0	4,0	5,6	2,4	-	-	-
C20:0	1,8	1,5	0,0	-	-	-
C22:0	2,4	1,9	0,0	-	-	-
C24:0	4,8	3,7	3,9	3,9	5,3	3,8
C26:0	3,2	2,6	2,9	9,9	12,0	10,2
C27:0	3,9	3,7	3,0	2,5	3,1	2,9
C28:0	26,8	19,9	38,3	57,5	56,1	57,2
C29:0	2,4	2,3	0,0	1,0	5,9	0,0
C30:0	11,7	11,3	17,2	16,0	12,0	14,2
C32:0	6,5	4,8	9,1	7,8	5,7	7,9
C34:0	6,0	4,4	4,2	1,2	0,0	3,5
Saturados	95,2	80,8	95,3	-	-	-
Insaturados	4,8	19,2	4,7	-	-	-

* Realizado nas condições do Teste E (saponificação 60', esterificação 40')

H&L (Hartman e Lago, 1973); L&R (Lepage e Roy, 1986); MMC (Mendez, Marrero e Canavaciolo, 2008)

Os valores apresentados na Tabela 20 são completamente diferentes, quando se quantificam os ácidos, principalmente em relação aos ácidos graxos majoritários. As variações chegam a 51% para o ácido palmítico (C16:0), 92,5% para o ácido octacosanóico (C28:0) e 52,2% para o ácido triacontanóico (C30:0).

As composições dos álcoois graxos sofreram menor variação quando comparadas aos ácidos graxos. Porém, no caso do nonacosanol, por exemplo, foram determinadas quantidades de 0% a 5,9%, lembrando sempre que as metodologias em questão foram aplicadas na mesma amostra.

A Tabela 21 apresenta a composição em ácidos e álcoois graxos do concentrado de ácidos graxos obtidos por destilação molecular, derivatizados por diferentes metodologias. Os cromatogramas referentes a esta Tabela estão na Figura A.2 do Apêndice.

Tabela 21 - Composição em ácidos e álcoois graxos do **concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular**, derivatizado segundo Hartman e Lago (1973), Lepage e Roy (1986) e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

Componente	Composição (%)					
	Ácidos			Álcoois		
	H&L*	L&R	MMC	H&L*	L&R	MMC
C16:0	20,3	19,0	21,5	-	-	-
C18:3	2,6	1,1	2,5	-	-	-
C18:1 e C18:2	7,3	7,8	5,7	-	-	-
C18:0	4,1	3,5	4,1	-	-	-
C20:0	1,8	1,6	1,8	-	-	-
C22:0	2,5	2,4	2,6	-	-	-
C24:0	5,5	5,2	5,4	1,9	2,3	0,0
C26:0	4,3	4,3	4,3	9,5	9,3	8,8
C27:0	6,3	6,3	6,0	2,1	2,0	1,8
C28:0	29,1	29,7	29,4	54,4	56,5	56,5
C29:0	2,6	2,7	2,7	0,0	3,9	0,0
C30:0	10,0	10,3	10,1	16,1	15,4	16,6
C32:0	3,7	3,9	3,8	9,0	8,9	10,7
C34:0	0,0	2,2	0,0	6,9	1,7	5,5
Saturados	90,1	91,1	91,8	-	-	-
Insaturados	9,9	8,9	8,2	-	-	-

* Realizado nas condições do Teste E (saponificação 60', esterificação 40')

H&L (Hartman e Lago, 1973); L&R (Lepage e Roy, 1986); MMC (Mendez, Marrero e Canavaciolo, 2008)

Comparando-se as metodologias de derivatização aplicadas ao concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular (CAGD), os resultados da composição em ácidos e álcoois graxos foram mais semelhantes, tanto para os ácidos como para os álcoois, provavelmente por se tratar de uma amostra mais pura.

Na Tabela 22 estão apresentadas as composições em ácidos e álcoois graxos do concentrado de ácidos graxos obtidos em escala laboratorial, derivatizados por diferentes metodologias. Alguns cromatogramas referentes a esta Tabela são mostrados na Figura A.3 do Apêndice.

Tabela 22 - Composição em ácidos e álcoois graxos dos **concentrados de ácidos graxos** obtidos nos Ensaios 1, 3, 4 e 5, derivatizados segundo Hartman e Lago (1973), Lepage e Roy (1986) e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

	Composição (%)					
	H&L		L&R	MMC		
	Ensaio 1*	Ensaio 3**	Ensaio 1	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
Ácidos						
16:0 - Palmítico	12,9	12,9	12,3	15,8	15,6	20,2
18:3 - Linolênico	0,6	1,2	1,1	1,3	0,6	0,0
18:1 e 18:2 – Oléico e Linoléico	4,0	5,8	3,1	3,0	2,7	3,7
18:0 - Esteárico	2,6	3,4	4,3	3,7	3,6	3,7
20:0 - Araquídico	1,3	1,5	1,4	1,7	1,6	1,7
22:0 - Docosanóico	2,1	2,2	2,0	2,4	2,4	2,6
24:0 - Tetracosanóico	4,8	5,1	4,6	5,1	5,3	5,4
26:0 - Hexacosanóico	4,0	4,1	4,0	4,1	4,1	4,1
27:0 - Heptacosanóico	5,6	6,0	5,5	5,2	6,3	5,3
28:0 - Octacosanóico	30,0	30,5	30,1	30,4	30,7	28,0
29:0 - Nonacosanóico	3,0	3,7	3,1	3,1	3,4	3,2
30:0 - Triacontanóico	13,9	14,2	13,8	13,9	11,9	11,5
32:0 - Dotriacontanóico	7,8	8,1	7,6	8,1	6,3	5,9
34:0 - Tetratriacontanóico	7,5	1,1	7,1	2,4	5,6	4,7
Saturados	95,5	93,0	95,8	95,8	96,7	96,3
Insaturados	4,5	7,0	4,2	4,2	3,3	3,7
Álcoois						
24:0 - Tetracosanol	4,0	4,6	6,1	4,3	5,8	6,3
26:0 - Hexacosanol	10,6	8,9	11,3	9,0	11,2	12,0
27:0 - Heptacosanol	2,6	3,0	3,4	1,1	2,6	2,8
28:0 - Octacosanol	57,8	45,0	56,2	48,3	59,4	59,0
29:0 - Nonacosanol	0,0	2,2	1,0	0,0	0,0	0,0
30:0 - Triacontanol	16,4	11,9	14,3	12,4	13,5	13,2
32:0 - Dotriacontanol	8,6	6,5	7,7	7,7	7,4	6,7
34:0 - Tetratriacontanol	0,0	17,8	0,0	17,3	0,0	0,0

* Ensaio 1 nas condições do Teste A (saponificação 20', esterificação 5')

** Ensaio 3 nas condições do Teste F (saponificação 60', esterificação 40' - solvente tolueno);

Ensaio 1 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 3 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:5, 1:3, 1:3); Ensaio 4 (saponificação 90', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 5 (saponificação 90', 1 extração – relação cera:EtOH - 1:5); H&L (Hartman e Lago, 1973); L&R (Lepage e Roy, 1986); MMC (Mendez, Marrero e Canavaciolo, 2008)

As composições em ácidos e álcoois graxos do concentrado obtido no Ensaio 1, derivatizado segundo Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste A e derivatizado segundo Lepage e Roy (1986) foram semelhantes, com maiores variações apenas em alguns compostos (ácido oléico e linoléico, ácido esteárico, tetracosanol e nonacosanol).

Com relação ao concentrado de ácidos graxos obtido no Ensaio 3, as maiores diferenças foram observadas para os ácidos palmítico, oléico, e linoléico e os álcoois heptacosanol, octacosanol e nonacosanol, quando comparadas as metodologias de Hartman e Lago (1973) (nas condições do Teste F) e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

Analisando-se todos os resultados apresentados na Tabela 22, a concentração do ácido octacosanóico (C28:0) foi de aproximadamente 30%, em relação aos ácidos graxos totais, com exceção do Ensaio 5, que apresentou teor de 28% para o C28:0 e a maior concentração para o ácido palmítico (20,2%). Para o octacosanol (C28:0-OH), as concentrações variaram entre 45% e 59,4%, em relação aos álcoois graxos totais, onde as maiores concentrações foram observadas nos Ensaios 4 e 5, que utilizaram maior tempo de saponificação (90 minutos).

A Tabela 23 mostra a concentração de álcool e ácidos graxos totais das amostras de cera de cana, do concentrado de ácidos graxos obtido em escala laboratorial (Ensaios 1, 3, 4 e 5) e do concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular.

As três metodologias de derivatização estudadas apresentaram resultados de teores de ácidos e álcoois graxos diferentes. Comparando-se os valores extremos obtidos na quantificação dos teores de álcoois e ácidos graxos nas amostras de cera de cana clarificada e purificada, as diferenças entre os métodos chegam a 44,9% para os álcoois e 23,9% para os ácidos. A Figura 16 ilustra de forma comparativa estes resultados.

Tabela 23 - Teores* (%) de álcoois e ácidos graxos totais da cera de cana-de-açúcar e concentrados, derivatizadas por diferentes métodos.

	Hartman e Lago (1973)				Lepage e Roy (1986)			Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008)				
	Cera **	CAG		CAGD**	Cera	CAG (Ensaio 1)	CAGD	Cera	CAG			CAGD
		Ensaio 1***	Ensaio 3****						Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	
Álcoois Graxos	31,6 ^a	13,2	16,2	19,7 ^a	22,5 ^b	12,6	21,5 ^b	21,8 ^b	12,2	12,1	12,1	19,8 ^a
Ácidos Graxos	16,6 ^a	27,2	30,9	52,2 ^a	17,1 ^a	25,1	47,3 ^b	13,8 ^b	38,9	29,0	25,1	62,6 ^c
Não Identificados	4,8 ^a	3,2	7,0	3,9 ^a	8,7 ^b	7,7	6,3 ^b	2,4 ^c	4,6	3,6	2,6	5,5 ^c

CAG – Concentrado de Ácidos Graxos obtido em escala laboratorial; CAGD – Concentrado de Ácidos Graxos obtido por Destilação Molecular

** Amostra derivatizada nas condições do Teste E (saponificação 60', esterificação 40')

*** Ensaio 1 nas condições do Teste A (saponificação 20', esterificação 5')

**** Ensaio 3 nas condições do Teste F (saponificação 60', esterificação 40' - solvente tolueno);

Ensaio 1 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 3 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:5, 1:3, 1:3); Ensaio 4 (saponificação 90', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 5 (saponificação 90', 1 extração – relação cera:EtOH - 1:5)

*Média das análises. Médias na mesma linha, para mesma amostra, acompanhadas da mesma letra, não diferem entre si, a 5% de significância

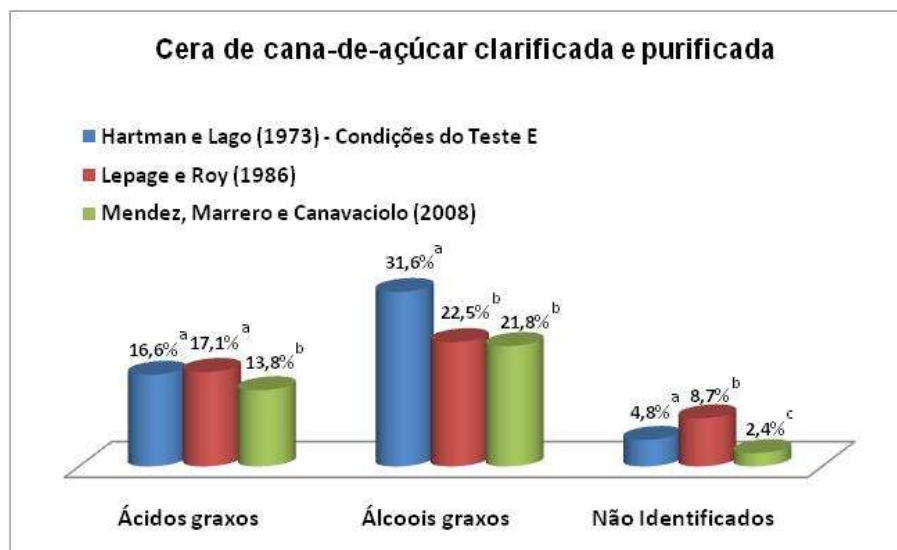


Figura 16 - Concentração de álcoois e ácidos graxos totais da cera de cana-de-açúcar derivatizada por diferentes métodos. Médias de um mesmo composto acompanhadas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância. Teste E (saponificação 60', esterificação 40').

Não houve diferença significativa entre os teores de ácidos graxos totais determinados segundo metodologia de Hartman e Lago (1973) (condições do Teste E) e Lepage e Roy (1986). Porém, para os álcoois graxos, o mesmo não ocorreu, onde o teor de álcoois graxos determinado segundo Hartman e Lago (1973) foi significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação às demais metodologias. As amostras de cera derivatizadas segundo Lepage e Roy (1986) apresentaram maior quantidade de picos não identificados (8,7%), conforme pode ser visto nas Figuras A.1, A.2 e A.3 do Apêndice.

Para o concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular (CAGD), a diferença observada foi maior. Conforme pode ser visualizado na Figura 17, a metodologia de derivatização proposta por Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008) foi a que resultou em maiores teores de ácidos no CAGD (62,6%). Os álcoois graxos determinados pelas três metodologias, variam entre 19,7% e 21,5%, não havendo diferença significativa entre as metodologias de Hartman e Lago (1973) – nas condições do Teste E – e Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

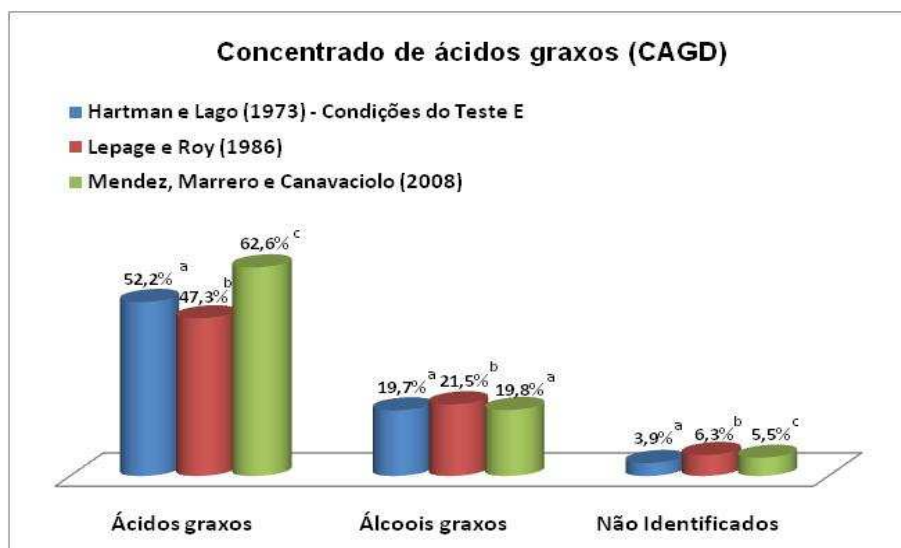


Figura 17 - Concentração de álcoois e ácidos graxos totais do concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular (CAGD), derivatizado por diferentes metodologias. Médias de um mesmo composto acompanhadas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância. Teste E (saponificação 60', esterificação 40').

Como não foram realizadas análises de todos os concentrados obtidos nos 5 ensaios utilizando as 3 metodologias de derivatização, não foi possível comparar as metodologias aplicadas a estas amostras.

O concentrado de ácidos graxos obtido em escala laboratorial (CAG), apresentou menor concentração de álcoois graxos totais (12,1-16,2%) e ácidos graxos totais (25,1-38,9%), quando comparado ao CAGD, segundo as metodologias de derivatização testadas (Tabela 23).

Durante as análises das amostras de cera derivatizadas segundo Lepage e Roy (1986) observou-se que parte da amostra não foi completamente solubilizada, conforme pode ser visto na Figura 18. Mesmo assim, os resultados encontrados não foram tão diferentes dos encontrados nas outras metodologias testadas, onde, em alguns casos, apresentou maiores teores (ácidos graxos totais – cera de cana e álcoois graxos totais – CAGD).



Figura 18 - Derivatização da amostra de cera de cana-de-açúcar segundo metodologia descrita por Lepage e Roy (1986)

Outras amostras de concentrados de ácidos e álcoois graxos de cera de cana foram analisadas (concentrado de álcoois graxos obtido por destilação molecular, concentrado de álcoois e ácidos graxos obtidos em escala laboratorial dos Ensaios 3, 4 e 5) e os resultados estão apresentados no Apêndice (Tabelas A.3 e A.4).

Os resultados das análises cromatográficas dos teores de ácidos e álcoois graxos presentes nas amostras da cera de cana clarificada e purificada e seus concentrados não são conclusivos, ou seja, não se pode afirmar qual metodologia de derivatização está correta. A metodologia de derivatização descrita por Hartman e Lago (1973) apresentou as maiores quantidades de álcoois e ácidos graxos totais para cera purificada e para o concentrado de ácidos graxos obtidos em escala laboratorial (teor de álcoois totais). Porém, quando testou-se esta metodologia em uma amostra com maior concentração de ácidos (CAGD), os teores de ácidos graxos totais apresentaram diferença de 19,9% em relação à metodologia de Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008).

O objetivo desta pesquisa foi obter um concentrado de ácidos graxos a partir de cera de cana clarificada e purificada. Logo, era necessária uma metodologia precisa para análise da concentração desses ácidos graxos de cadeia longa, contida nos concentrados obtidos, para avaliar a eficiência do processo empregado na produção desses concentrados. A metodologia de Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008) foi desenvolvida para determinação de

D-003 (concentrado purificado de ácidos graxos de cadeia longa provenientes de cera de cana-de-açúcar), em comprimidos, enquanto que as outras metodologias testadas nesta pesquisa são utilizadas na determinação de ácidos graxos de várias classes de lipídios. Como a metodologia de Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008) foi a que resultou em maiores teores de ácidos graxos totais para o CAGD (amostra com maior teor de ácidos graxos dentre as analisadas) decidiu-se por adotá-la para quantificação de ácidos e álcoois dos concentrados obtidos nos últimos ensaios laboratoriais.

4.7. Comparação entre as concentrações de ácidos e álcoois graxos dos concentrados de ácidos graxos obtidos em escala laboratorial.

Na Tabela 24 são apresentadas as concentrações de álcoois e ácidos graxos contidas nos concentrados obtidos nos Ensaios 1, 3, 4 e 5. Os teores do Ensaio 1, apresentados nesta Tabela, foram determinados segundo metodologia de Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste A (saponificação 20', esterificação 5') e os demais, segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008). Não foi feita análise no concentrado do Ensaio 2.

Tabela 24 - Teores* de álcoois e ácidos graxos totais dos **concentrados de ácidos graxos** obtidos em escala laboratorial.

	Ácidos	Álcoois
Ensaio 1**	27,2%	13,2%
Ensaio 3***	38,9%	12,2%
Ensaio 4***	29,0%	12,1%
Ensaio 5***	25,1%	12,1%

*Média das análises. **Amostras derivatizadas segundo Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste A (saponificação 20', esterificação 5'). *** Amostras derivatizadas segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008). Ensaio 1 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 3 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:5, 1:3, 1:3); Ensaio 4 (saponificação 90', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 5 (saponificação 90', 1 extração – relação cera:EtOH - 1:5)

Os rendimentos, em massa, dos concentrados de ácidos graxos obtidos nos ensaios laboratoriais foram próximos (média de $40,3\% \pm 1,6$), porém, houve variação dos teores de ácidos graxos (AG) para cada ensaio, com destaque para o Ensaio 3, que apresentou o maior teor de AG (38,9%). O Aumento do tempo de saponificação da amostra de cera na primeira etapa do processo de obtenção do concentrado de AG (Ensaio 4 e 5), não representou aumento significativo no teor de AG (aumento de 6,6% apenas – Ensaio 1 e 4). O ensaio que obteve o maior rendimento de AG (Ensaio 3) foi também o que utilizou maior quantidade de etanol (relação cera saponificada:EtOH – 1:11), representando um aumento de 55% no teor de AG em relação ao ensaio que apresentou menor rendimento e menor relação cera saponificada:EtOH (Ensaio 5). Então, pode-se concluir que o concentrado obtido no Ensaio 3, lavado com maior quantidade de etanol, foi o que apresentou maior pureza, também refletida no menor rendimento (38,0%). Em todos os ensaios apresentados na Tabela 24, os teores de álcoois graxos totais foram próximos.

Nuissier et al. (2002) analisaram extratos de cera de cana bruta obtidos após fracionamento com solventes orgânicos. As amostras foram saponificadas, aciduladas e analisadas por GC/MS. O extrato insolúvel em metanol, acetona e solúvel em isooctano apresentou teor de ácidos graxos totais de 36% (55% de ácido palmítico) e de álcoois graxos totais de 31% (81% de octacosanol). O extrato insolúvel em metanol, acetona e isooctano apresentou teor de ácidos graxos totais de 28% (42% de ácido palmítico) e de álcoois graxos totais de 32% (63% de octacosanol). As composições dos extratos reportadas pelos autores foram bem diferentes das composições encontradas nos concentrados de ácidos graxos desta pesquisa devido à matéria-prima utilizada (cera bruta de cana contendo fração oleosa) e também ao método de obtenção dos extratos (fracionamento com outros tipos de solvente).

Até a conclusão desta pesquisa (novembro de 2009), não foram encontrados trabalhos semelhantes a este, ou seja, de obtenção e caracterização de concentrados de ácidos graxos obtidos a partir de cera de cana purificada. A maioria dos estudos está voltada para os concentrados de álcoois graxos e, portanto, não foi possível realizar comparação entre os dados de concentração de ácidos graxos totais obtidos neste estudo e os dados da literatura.

Após a comparação das metodologias de derivatização testadas neste trabalho, observou-se que há necessidade de uma adaptação desses métodos, para possibilitar a quantificação dos ácidos graxos totais presentes em ceras de maneira segura.

5. CONCLUSÕES

- A cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada utilizada como matéria-prima nesta pesquisa apresentou algumas características físico-químicas diferenciadas em relação a outras ceras de cana purificadas reportadas na literatura, como os teores de matéria insaponificável e saponificável, provavelmente em consequência do processo de purificação industrial empregado.
- O processo de obtenção do concentrado de ácidos graxos a partir de cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada utilizando unicamente álcool como solvente de extração, mostrou-se tecnicamente viável, com rendimentos em torno de 40% e pureza entre 25,1% e 38,9%. O processo que apresentou maior concentração de ácidos graxos totais foi o que utilizou três lavagens com etanol a quente e relação cera saponificada:etanol de 1:5-1:3-1:3, (p/v). Observou-se que a pureza dos concentrados depende da quantidade de extrações e do volume de etanol empregado.
- A obtenção do concentrado de ácidos graxos utilizando a técnica de destilação molecular apresentou rendimento de 23,4%, com pureza entre 52,2% e 62,6%, dependendo da metodologia de derivatização aplicada.
- Foram testadas três metodologias de derivatização para determinação da composição e concentração dos álcoois e ácidos graxos presentes na cera e concentrados obtidos em escala laboratorial e por destilação molecular. Nenhuma metodologia pôde ser apontada como eficiente para quantificação de álcoois e ácidos graxos simultaneamente, tanto nas amostras de cera como nos concentrados analisados. É necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica confiável para a quantificação de ácidos graxos de cadeia longa presentes neste tipo de amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRIANUAL 2007: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo. FNP. p.251-253, 2007.

AGUILERA, R. C.; RUIZ, R. L. Torta. In: ICIDCA (Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados de Cana de Açúcar). **Manual dos derivados de cana-de-açúcar**. Brasília: ABIPTI, p.57-61.1999.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 5.ed. Champaign, IL: AOCS Press, 2004.

ANTOLÍN, E. M.; DELANGE, D. M.; CANAVACIOLO, V. G.; GRANJA, A. L. GC determination of long chain fatty acids that compose D003 in 5-mg film-coated tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 4, p. 613-620, 2003.

ARRUZAZABALA, M. D.; CARBAJAL, D.; MÁS, R.; MOLINA, V.; CASTAÑO, G.; GAMEZ, R. Effects of D-003, a new compound purified from sugarcane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers - A randomised, double-blind clinical study. **Clinical Drug Investigation**, v. 23, n. 2, p. 107-118, 2003.

AVALIAÇÃO da área de cana disponível para colheita na safra 2008/09. UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/downloads/estatisticas/canasat_2008.pdf>. Acesso em: 25 maio 2009.

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

AZZAM, A. M. Separation and analysis of wax from Egyptian sugar cane filter press cake. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.86, n.6, p.247-250, 1984.

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.

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

BERTHOLD, R. **Beeswax crafting**. Wicwas Press, Cheshire, Conn., U.S.A., 1993. 128 p.

BOTEGA, D. C. Z.; BARRERA-ARELLANO, D. Clarificação de cera bruta de cana-de-açúcar utilizando peróxido de hidrogênio. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓLEOS E GORDURAS, 14., 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 2007. CD-ROM.

CARDOSO, C. H. S.; LOPES, J. J. C.; BORGES, M. T. M. R.; ALMADA, S. L. Análise da composição de cera de torta de filtro em função dos processos de colheitas adotados: extração, purificação e caracterização. In: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFSCar, 8., 2009, São Carlos. **Anais eletrônicos...** São Carlos: UFSCar, 2009, p. 425. Disponível em: <<http://www.jornada2009.nit.ufscar.br/cic/uploads/C13/C13-004.pdf>>. Acesso em: 04 dez 2009.

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

CASTAÑO, G.; MÁZ, R.; FERNÁNDEZ, L.; LÓPEZ, E.; GUTIÉRREZ, J. A.; ILLNAIT, J.; FERNÁNDEZ, J. C.; GÁMEZ, R.; ALVAREZ, E. Assessment of the effects of D-003, a new antiplatelet and lipid-lowering compound, in healthy volunteers. Phase I clinical study. **Drugs R & D**, v. 3, n. 5, p. 337-348, 2002.

CASTAÑO, G.; MENÉNDEZ, R.; MÁZ, R.; LEDON, N.; FERNANDEZ, J.; PEREZ, J.; GONZALEZ, R. M.; LEZCAY, M. Effects of D-003, a new hypocholesterolaemic and antiplatelet compound, on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. **Clinical Drug Investigation**, v. 23, n. 3, p. 193-203, 2003.

CHRISTIE, W. W. **Waxes**: Structure, Composition, Occurrence and Analysis. Dundee: Scottish Crop Research Institute, 2008. Disponível em:<<http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/waxes/file.pdf>>. Acesso em: 20 abril 2009. Atualizado em 7 mar 2008.

COUPLAND, K.; NICHOLS, J. A. Lipids: their use in personal care products. In: GUNSTONE, F. D.; PADLEY, F. B. **Lipid Technologies and Applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. Chap. 26, p.695-709.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p.7-84.

FIGUEIREDO, P.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P. **Cana-de-açúcar** (compact disc) 6. ed. Campinas: IAC, 1995 (IAC. Boletim 200).

FRUTUOSO, E. S. **Extração, refinação e estudo das propriedades termodinâmicas de cera de cana-de-açúcar**. 1989. 65p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1989.

GÁMEZ, R. MENDONZA, S; MÁZ, R.; MESA, R.; CASTAÑO, G.; RODRIGUEZ, B.; MARRERO, D. Dose-dependent cholesterol-lowering effects of D-003 on normocholesterolemic rabbits. **Current Therapeutic Research**, v. 61, n. 7, p. 460-468, 2000a.

GÁMEZ, R.; GONZALEZ, J. E.; RODEIRO, I.; FERNANDEZ, I.; ALEMAN, C.; RODRIGUEZ, M. D.; ACOSTA, P. C.; GARCIA, H. In Vivo Genotoxic Evaluation of D-003, a Mixture of Very Long Chain Aliphatic Acids. **Journal of Medicinal Food**, v. 4, n. 2, p. 85-91, 2001.

GÁMEZ, R.; MAS, R.; MENENDEZ, R.; GARCIA, H.; GONZALEZ, J.; PEREZ, Y.; GOICOCHEA, E. Effects of chronic administration of D-003, a mixture of sugar cane wax high molecular acids, in beagle dogs. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 30, n. 2, p. 75-88, 2004.

GÁMEZ, R.; MÁZ, R.; NOA, M.; MENÉNDEZ, R.; ALEMÁN, C.; ACOSTA, P.; GARCÍA, H.; HERNÁNDEZ, C.; AMOR, A.; PÉREZ, J.; GOICOCHEA, E. Acute and oral subchronic toxicity of D-003 in rats. **Toxicology Letters**, v. 118, p. 31-41, 2000b.

GÁMEZ, R.; MAS, R.; NOA, M.; MENENDEZ, R.; GARCIA, H.; GONZALEZ, J.; PEREZ, Y.; GOICOCHEA, E. Six-Month Toxicity Study of Oral Administration of D-003 in Sprague Dawley Rats. **Drugs R & D**, v. 3, n. 6, p. 375-386, 2002a.

GÁMEZ, R.; NOA, M.; MAS, R.; MENDOZA, N.; PARDO, B.; MENÉNDEZ, R.; PÉREZ, Y.; GONZÁLEZ, R. M.; GUTIÉRREZ, A.; MARRERO, G.; GOICOCHEA, E.; GARCÍA, H.; CURVECO, D. Long-term carcinogenicity of D-003, a mixture of high molecular weight acids from sugarcane wax, in Sprague Dawley rats: A 24 months study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2352-2358, 2007b.

GÁMEZ, R.; NOA, M.; MÁZ, R.; RODRÍGUEZ, M.; RODEIRO, I.; MENÉNDEZ, R.; HERNÁNDEZ, C.; GARCÍA, H. Toxicología Subcrónica Oral del D-003 en Ratones NMRI. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 663-668, 2007a.

GÁMEZ, R.; RODEIRO, I.; FERNANDEZ, I.; ACOSTA, P. C. Preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: Mixture of very long chain fatty acids. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 22, n. 3, p. 175-181, 2002b.

GANDRA, K. M. **Obtenção e caracterização de cera de cana-de-açúcar e suas frações**. Campinas, 2006. 148f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GARCIA, A.; GARCIA, M.A. Soxhlet extraction of crude wax from sugar cane. **The Journal of Tecator**, v. 20, n. 1, 1996.

GARCÍA, A. G.; RODRÍGUEZ, G. B.; TÍO, M. V. Cera refinada de torta. In: **Manual dos derivados de cana-de-açúcar (ICIDCA)**. Brasília: ABIPTI, 1999. p.399-404.

GARCÍA, A.; GARCÍA, M. A.; RIBAS, M.; BROWN, A. Recuperacion de cera de cuticula de cana de azucar mediante separacion mecanica y extraccion con solventes. **Grasas y Aceites**, v. 54, n. 2, p. 169-174, 2003.

GARCÍA, A.; TÍO, M. V.; ALVAREZ, A. Cera de cachaza. Desarrollo actual y perspectivas. In: **Subproductos y derivados de la agroindustria azucarera**. México, Geplacea, 1988. p. 315-327.

GONZÁLEZ, L.; MARRERO, D.; LAGUNA, A.; MAS, R.; VALMANA, M.; CARBAJAL, D.; MADINA, M.; MENENDEZ, R. **Mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax**. Patente CU22723. PCT Application PCT/IB98/00870. Publication number WO 98/043631. 1997.

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.

GREENER-DONHOWE, I.; FENNEMA, O. Water vapor and oxygen permeability of wax films. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.70, n.9, p.867-873, 1993.

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

GUNSTONE, F. D.; PADLEY, F. B. **Lipid Technology and Applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. 834p.

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

HARGROVE, J. L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D. K. Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. **Experimental Biology and Medicine**, MayWood, v.229, n.3, p.215-226, 2004.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973.

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

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

KANYA, T. C. S.; RAO, L. J.; SASTRY, M. C. S. Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1552–1557, 2007.

KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. FAO Agricultural Services Bulletin, n.124, 1996. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/w0076E/w0076E00.htm>>. Acesso em: 14 dez 2009.

LEDÓN, N.; CASACÓ, A.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, A.; CRUZ, J.; GONZÁLEZ, R.; CAPOTE, A.; TOLON, Z.; ROJAS, E.; RODRÍGUEZ, V. J.; MERINO, N.; RODRÍGUEZ, S.; ANCHETA, O.; CANO, M. C. Effects of a mixture of fatty acids from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax oil in two models of inflammation: Zymosan-induced arthritis and mice tail test of psoriasis. **Phytomedicine**, v. 14, n. 10, p. 690-695, 2007.

LEPAGE, G; ROY, C. C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. **Journal of Lipid Research**, v. 27, p. 114-120, 1986.

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.

LUCCHESI, A. A Processos fisiológicos da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*). **Boletim técnico, ESALQ/CENA**, n.7, PCLQ/USP, Piracicaba. p.1-3. 1995. 50p.

MANOHAR RAO, P.J. **Industrial utilization of sugarcane and its co-products**, ISPCK Publishers and Distributors, Delhi-India, 1997.

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

MATKIN, J. R.; WANG, S.; LI, C.; HUANG, W. **Natural mixture of long-chain fatty alcohols and long-chain fatty acids, its obtension from animal and vegetable waxes and its nutraceutical uses**. Patent US 2006/0013842 A1. 2006.

MATSUOKA, S.; LAVORENT, N. A.; MENEZES, L. L.; SAILIBE, A. C.; GHELLER, A. C. A.; ARIZONO, H. Novas variedades de cana-de-açúcar para a região oeste do estado de São Paulo. IN: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7, Londrina, 1999. **Anais...** Piracicaba: STAB, 1999. p.34-39.

MATTHIES, L. Natural montan wax and its raffinates. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.103, n.2, p.239-248, 2001.

MENDEZ, E. J.; MARRERO, D.; CANAVACIOLO, V. G. GC Determination of Long and Very Long Chain Fatty Acids (C24:0-C36:0) that Compose D003 in 5-mg Film-coated Tablets by a Fast Methylation Method. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 4, p. 584-590, 2008.

MENDOZA, S.; GÁMEZ, R.; MAS, R.; GOICOCHEA, E. Effects of D-003, a mixture of long-chain aliphatic primary acids, fluvastatin and the combined therapy of D-003 plus fluvastatin on the lipid profile of normocholesterolemic rabbits. **International Journal of Tissue Reactions - Experimental and Clinical Aspects**, v. 25, n. 3, p. 81-89, 2003.

MENDOZA, S.; GAMÉZ, R.; NOA, M.; MÁZ, R.; CASTAÑO, G.; MESA, R.; MESA, M.; ARMAS, M. Comparison of the effects of D-003 and policosanol on lipid profile and endothelial cells in normocholesterolemic rabbits. **Current Therapeutic Research**, v. 62, n. 3, p. 209-220, 2001.

MENÉNDEZ, R.; MÁZ, R. AMOR, A. M.; RODEIROS, I.; GONZÁLEZ, R. M.; ALFONSO, J. L. Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D-003, a mixture of very long chain saturated fatty acids. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 4, p. 299-304, 2001.

MENÉNDEZ, R.; MÁZ, R.; AMOR, A. M.; LEDÓN, N.; PÉREZ, J.; GONZÁLEZ, R. M.; RODEIRO, I.; ZAYAS, M.; JIMÉNEZ, S. Inhibition of rat lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D-003, a mixture of very long-chain saturated fatty acids. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 13-21, 2002.

MOLDOVAN, Z.; JOVER, E.; BAYONA, J. M. Gas chromatographic and mass spectrometric methods for the characterisation of long-chain fatty acids - Application to wool wax extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, p. 359-378, 2002.

MOLINA, V.; ARRUZAZABALA, M. L.; CARBAJAL, D.; MÁZ, R. D-003, a potential antithrombotic compound isolated from sugar cane wax with effects on arachidonic acid metabolites. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, n. 1, p. 19-24, 2002.

MOLINA, V.; ARRUZAZABALA, M. L.; CARBAJAL, D.; MÁZ, R.; VALDÉS, S. Antiplatelet and antithrombotic effect of D-003. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 2, p. 137-143, 2000.

MOLINA, V.; CARBAJAL, D.; ARRUZAZABALA, L.; MAS, R. Effect of D-003 on intravascular platelet aggregation induced with collagen in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 2, p. 232-236, 2005.

MORRISON III, W. H.; HOLSER, R.; AKIN, D. E. Cuticular wax from flax processing waste with hexane and super critical carbon dioxide extractions. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 2, p. 119-122, 2006.

MUÑOZ, D. H. **Las ceras – Introducción y aplicaciones**; Ceras Naturales, vegetales y animales; Ceras como aditivos en productos alimenticios; El uso de las ceras en el recubrimiento de quesos. 2005. Disponível em: <http://iberceras.com/paginas_english/publications.htm>. Acesso em: 20 abr 2009.

NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v.11, n.5, p.453-457, 2000.

NUISSIER, G.; BOURGEOIS, P.; GRIGNON-DUBOIS, M.; PARDON, P.; LESCURE, M. H. Composition of sugarcane waxes in rum factory wastes. **Phytochemistry**, v.61, p.721-726, 2002.

PAIXÃO, A. L. **Obtenção de concentrado de álcoois graxos de cadeia longa a partir de cera de cana de açúcar saponificada e acidulada**. Campinas, 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

PARISH, E. J.; LI, S.; BELL, A. D. Chemistry of waxes and sterols. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. 3rd Ed. New York: CRC Press, 2007. Cap. 4, pp. 99-121. Disponível em: <http://www.foodnetbase.com//books/6323/46632_C004.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2009.

PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry**: an introduction to their industrial utilization. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1989. 435p.

PÉREZ, Y.; MENÉNDEZ, R.; FERRER, J. I.; LOPEZ, E.; CASTAÑO, G.; FERNÁNDEZ, J.; FERREIRO, R. M.; FERNÁNDEZ, L.; MENDOZA, S.; GONZÁLEZ, R.; MESA, M. Effects of D-003, a mixture of high-molecular-weight sugar cane wax acids, on lipid peroxidation markers in older individuals: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Current Therapeutic Research**, v. 69, n. 1, p. 36-48, 2008.

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 the sugar industry. **Separation and Purification Technology**, v.17, p.189-194, 1999.

PINA, M.; OZENNE, C.; LAMBERET, G.; MONTET, D.; GRAILLE, J. Contribution of Grignard reagents in analysis of short-chain fatty acids. In: SEBEDIO, J. L.; PERKINS, E. G. **New Trends in Lipid and Lipoprotein Analysis**. Champaign: AOCS Press, 1995. Chap.18, p.242-249.

PINA, M.; PIOCH, D.; GRAILLE, J. Rapid analysis of jojoba wax fatty and alcohols after derivatization using Grignard reagents. **Lipids**, v. 22, n. 5, p. 358-361, May, 1987.

QUINTELA, A. C. R.; ANDRARE, L. A. B.; CARVALHO, G. J. ; BOCARDO, M. R. Efeito do plantio de cana inteira com e sem desponete e da compactação pós-cobertura em duas variedades de cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v.16, n. 1, p. 12-13, 1997.

REZANKA, T.; SIGLER, K. Identification of very long chain fatty acids from sugar cane wax by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 67, n.9, p. 916-923, 2006.

REZANKA, T.; SIGLER, K. Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. **Progress in Lipid Research**, v. 48, p. 206-238, 2009.

RODRÍGUEZ, M. D.; GÁMEZ ,R.; GONZÁLEZ, J. E.; GARCÍA, H.; ACOSTA, C. P.; GOICOCHEA, E. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long-chain fatty acids in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 89–93, 2003.

ROHR, R.;TRUJILLO-QUIJANO, J. A. **Processo para extração e concentração de vitaminas e provitaminas lipossolúveis, fatores de crescimento e hormônios vegetais e animais, presentes nos resíduos e subprodutos das indústrias de produtos vegetais e animais**. Patente no. PI 0002359-0, 19 jun 2000. Número de Publicação Internacional WO 01/98444 A2.

ROZÁRIO, C. H. R. do. **Desenvolvimento de um processo para a obtenção de policosanol a partir de cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)**. Campinas, 2006. 113f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SAUCEDO, B. E. L.; RODRÍGUEZ, A. C. R.; ALVAREZ, O. Q.; RABÍ, L. C. Determinación de Metales Pesados en un Suplemento Nutricional de Origen Natural con Propiedades Antioxidantes. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 760-764, 2007.

SAYERS, R. **Wax – An Introduction**. European Wax Federation and Gentry Books, London, 1983.

SCAVARIELLO, E. M. S.; BARRERA-ARELLANO, D. Optimización Del proceso de acidulación de la borra de neutralización de aceite de salvado de arroz. **Grasas y Aceites**, v. 55, Fasc. 2, p. 155-159, 2004.

SETOR Sucroenergético - Mapa da Produção. UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode={D6C39D36-69BA-458D-A95C-815C87E4404D}>>. Acesso em 26 maio 2009.

SZMRECSÁNYI, T. Efeitos e desafios das novas tecnologias na agroindústria canavieira. In: MORAES, M. A. F. D. de; SHIKIDA, P. F. A (Org). **Agroindústria canavieira no Brasil**: evolução, desenvolvimento e desafios. São Paulo: Atlas, 2002. Cap. 4, p. 93-119.

TORO-VAZQUEZ, J. F.; MORALES-RUEDA, J. A.; DIBILDOX-ALVARADO, E.; CHARÓ-ALONSO, M.; ALONZO-MACIAS, M; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. M. Thermal and Textural Properties of Organogels Developed by Candelilla Wax in Safflower Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 989-1000, 2007.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Cana-de-açúcar - Qual a dimensão da cana-de-açúcar no Brasil e no mundo?** Disponível em: <<http://www.unica.com.br/FAQ/>>. Acesso em: 14 dez 2009.

USDA. United States Department of Agriculture. **Plants Profile.** *Saccharum officinarum* L. sugarcane. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SAOF>>. Acesso em: 28 set. 2007.

VIEIRA, T. M. F. S. **Obtenção de cera de cana-de-açúcar a partir de subproduto da indústria sucro-alcooleira: extração, purificação e caracterização.** Campinas, 2003. 139f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VIEIRA, T. M. F. S.; BARRERA-ARELLANO, D. **Processo de obtenção de cera de torta de filtração de cana-de-açúcar.** Patente Brasileira PI0205153-2, 2002. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VILLAR, J.; GARCÍA, M. A.; GARCÍA, A.; MANGANALLY, E. Crude wax extraction from filter cake in stirred tank. **International Sugar Journal**, v.107, n.1277, p.308-311, 2005.

WADA, J. K. A. **Processo simplificado para obtenção de policosanol a partir de cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada.** Campinas, 2008. 105f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

WARTH, A. H. **Chemistry and Technology of Waxes.** New York, Reinhold, 1947.

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

APÊNDICE

Tabela A.1 - Composição em ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar purificada, segundo vários autores.

Ácidos	Cera estudada* (Teste A)	Paixão (2008)	Gandra (2006)
C16:0 - Palmítico	22,5	26,7	25,7
C18:3 - Linolênico	3,3	8,0	10,7
C18:1 e C18:2 – Oléico e Linoléico	7,1	10,1	10,0
C18:0 - Esteárico	3,9	5,5	4,6
C20:1 - Eicosenóico	-	-	0,7
C20:0 - Araquídico	1,6	2,4	2,1
C22:0 - Docosanóico	2,1	2,9	1,7
C24:0 - Tetracosanóico	4,1	5,3	3,8
C26:0 - Hexacosanóico	2,9	3,0	2,8
C27:0 - Heptacosanóico	4,9	-	-
C28:0 - Octacosanóico	24,8	20,1	20,0
C29:0 - Nonacosanóico	2,0	-	-
C30:0 - Triacontanóico	10,1	13,1	11,3
C32:0 - Dotriacontanóico	5,4	2,9	3,4
C34:0 - Tetratriacontanóico	5,3	-	3,2

* Amostra derivatizada segundo Hartman e Lago (1973), nas condições do Teste A (saponificação 20', esterificação 5')

Tabela A.2 - Composição em álcoois graxos da cera de cana-de-açúcar purificada, segundo vários autores.

Álcoois	Cera estudada*	Wada (2008)*	Gandra (2006)*	Rozário (2006)**	Vieira (2003)**
C24:0 - Tetracosanol	3,2	4,3	2,7	1,8	7,1
C26:0 - Hexacosanol	10,4	13,1	11,8	15,3	8,9
C27:0 - Heptacosanol	2,7	3,0	3,8	3,1	-
C28:0 - Octacosanol	58,5	64,6	62,8	59,3	67,3
C29:0 - Nonacosanol	0,8	-	5,5	9,7	-
C30:0 - Triacontanol	15,6	11,2	9,9	8,2	11,1
C32:0 - Dotriacontanol	7,6	3,9	3,6	2,6	5,6
C34:0 - Tetratriacontanol	1,0	-	-	-	tr

* Derivatização segundo Hartman e Lago (1973), nas condições do Teste A (saponificação 20', esterificação 5')

** Derivatização com reagente de Grignard (PINA et al., 1987 adaptado por VIEIRA, 2003).

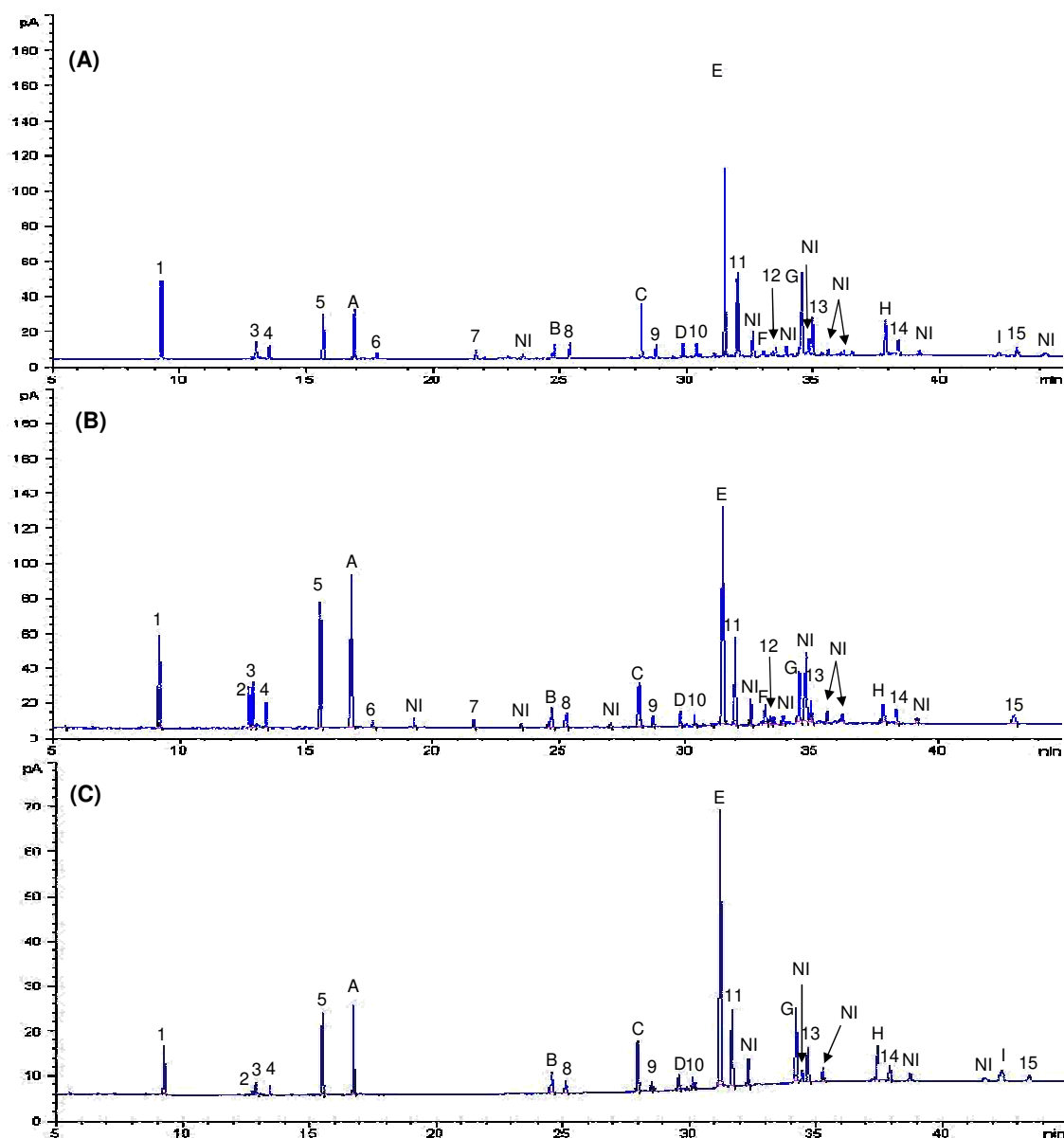


Figura A.1 - Determinação comparativa da composição e concentração de álcoois e ácidos graxos em cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada, derivatizada segundo metodologia de **(A)** Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste E, **(B)** Lepage e Roy (1986) e **(C)** Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008). 1:ácido palmítico (C16:0); 2: ácido linolênico(C18:3); 3: ácido oléico e linoléico (C18:1 e C18:2); 4: ácido esteárico (C18:0); 5: ácido nonacosanóico (C19:0); 6: ácido eicosanóico (C20:0); 7: ácido docosanóico (C22:0); 8: ácido tetracosanóico (24:0); 9: ácido hexacosanóico (C26:0); 10: ácido heptacosanóico (C27:0); 11: ácido octacosanóico (C28:0); 12: ácido nonacosanóico (C29:0); 13: ácido triacontanóico (C30:0); 14: ácido dotriacontanóico (C32:0); 15: ácido tetratriacontanóico (C34:0); A: eicosanol (C20:0); B: tetracosanol (C24:0); C: hexacosanol (C26:0); D: heptacosanol (C27:0); E: octacosanol (C28:0); F: nonacosanol (C29:0); G: triacontanol (C30:0); H: dotriacontanol (C32:0); I: tetratriacontanol (C34:0); NI: não identificados.

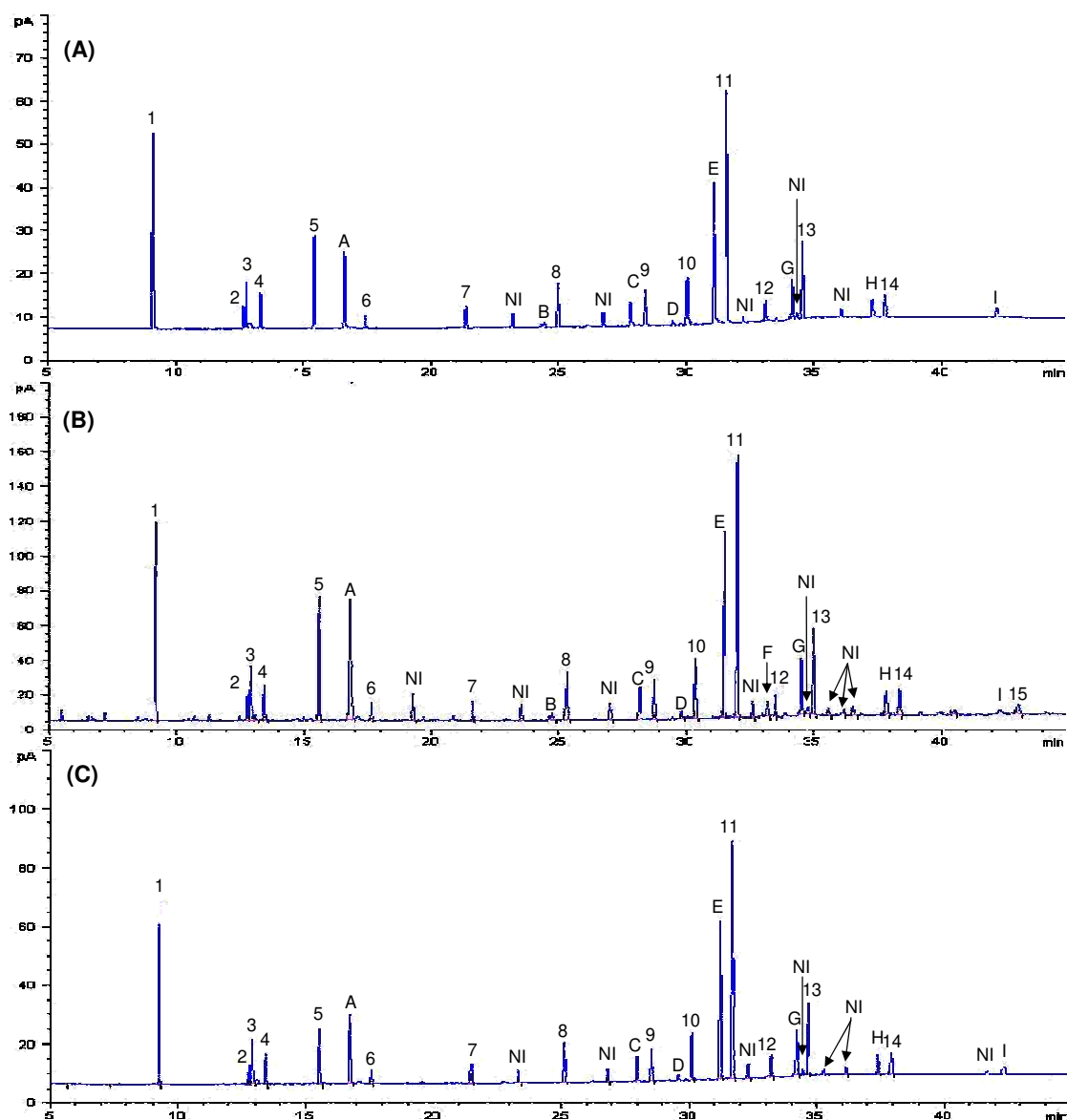


Figura A.2 - Determinação comparativa da composição e concentração de álcoois e ácidos graxos do concentrado de ácidos graxos obtido por destilação molecular (CAGD), derivatizado segundo metodologia de **(A)** Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste E, **(B)** Lepage e Roy (1986) e **(C)** Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008). 1:ácido palmítico (C16:0); 2: ácido linolênico(C18:3); 3: ácido oléico e linoléico (C18:1 e C18:2); 4: ácido esteárico (C18:0); 5: ácido nonacosanóico (C19:0); 6: ácido eicosanóico (C20:0); 7: ácido docosanóico (C22:0); 8: ácido tetracosanóico (C24:0); 9: ácido hexacosanóico (C26:0); 10: ácido heptacosanóico (C27:0); 11: ácido octacosanóico (C28:0); 12: ácido nonacosanóico (C29:0); 13: ácido triacontanóico (C30:0); 14: ácido dotriacontanóico (C32:0); 15: ácido tetratriacontanóico (C34:0); A: eicosanol (C20:0); B: tetracosanol (C24:0); C: hexacosanol (C26:0); D: heptacosanol (C27:0); E: octacosanol (C28:0); F: nonacosanol (C29:0); G: triacontanol (C30:0); H: dotriacontanol (C32:0); I: tetratriacontanol (C34:0); NI: não identificados.

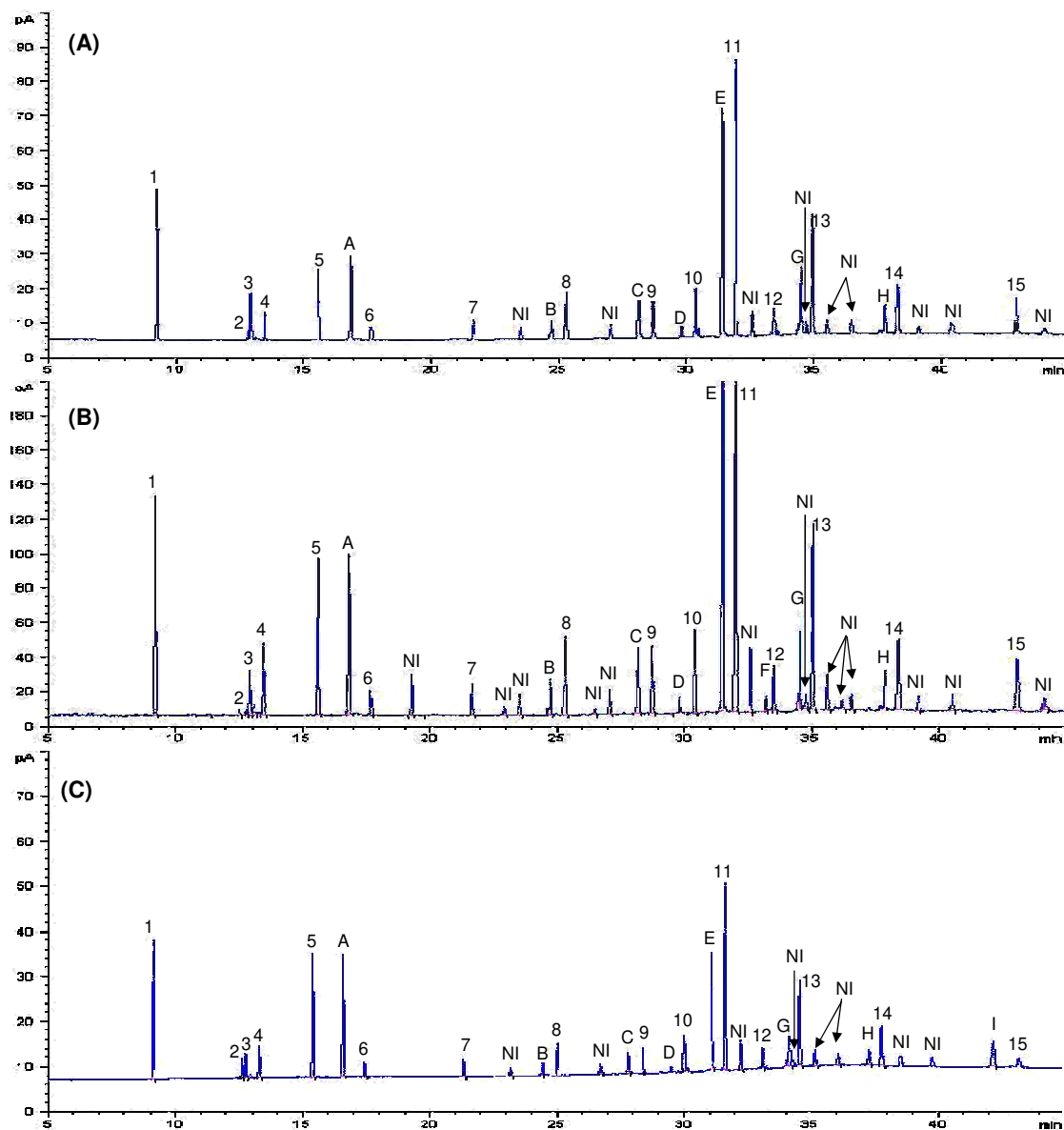


Figura A.3 - Determinação comparativa da composição e concentração de álcoois e ácidos graxos do concentrado de ácidos graxos, obtido em escala laboratorial, derivatizado segundo metodologia de **(A)** Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste A (Amostra do Ensaio 1), **(B)** Lepage e Roy (1986) (Amostra do Ensaio 1) e **(C)** Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008) (Amostra do Ensaio 3). 1:ácido palmítico (C16:0); 2: ácido linolênico(C18:3); 3: ácido oléico e linoléico (C18:1 e C18:2); 4: ácido esteárico (C18:0); 5: ácido nonacosanóico (C19:0); 6: ácido eicosanóico (C20:0); 7: ácido docosanóico (C22:0); 8: ácido tetracosanóico (C24:0); 9: ácido hexacosanóico (C26:0); 10: ácido heptacosanóico (C27:0); 11: ácido octacosanóico (C28:0); 12: ácido nonacosanóico (C29:0); 13: ácido triacontanóico (C30:0); 14: ácido dotriacontanóico (C32:0); 15: ácido tetratriacontanóico (C34:0); A: eicosanol (C20:0); B: tetracosanol (C24:0); C: hexacosanol (C26:0); D: heptacosanol (C27:0); E: octacosanol (C28:0); F: nonacosanol (C29:0); G: triacontanol (C30:0); H: dotriacontanol (C32:0); I: tetratriacontanol (C34:0); NI: não identificados.

Tabela A.3 - Composição e concentração em ácidos e álcoois graxos dos **concentrados de álcoois graxos** da cera de cana-de-açúcar, obtidos por destilação molecular (CALGD) e em escala laboratorial (CALG).

Componente	Composição (%)									
	Ácidos					Álcoois				
	CALGD*	CALGD**	CALG*** Ensaio 3	CALG*** Ensaio 4	CALG*** Ensaio 5	CALGD*	CALGD**	CALG*** Ensaio 3	CALG*** Ensaio 4	CALG*** Ensaio 5
C16:0	32,4	100	40,9	36,9	31,7	-	-	-	-	-
C18:3	0,0	0,0	5,4	2,3	0,0	-	-	-	-	-
C18:1 e C18:2	11,3	0,0	22,5	12,8	8,5	-	-	-	-	-
C18:0	6,3	0,0	7,1	6,7	6,2	-	-	-	-	-
C20:0	0,0	0,0	0,9	2,0	1,9	-	-	-	-	-
C22:0	0,0	0,0	0,0	2,8	2,7	-	-	-	-	-
C24:0	0,0	0,0	1,5	4,0	4,4	5,2	5,9	3,6	3,8	4,5
C26:0	0,0	0,0	0,0	1,7	2,9	10,8	11,5	10,4	11,3	10,8
C27:0	0,0	0,0	0,0	2,8	4,2	3,1	3,1	2,7	2,7	2,7
C28:0	20,7	0,0	13,0	10,9	19,2	57,9	58,3	58,4	62,3	61,6
C29:0	29,3	0,0	3,1	5,9	6,5	1,2	1,1	0,8	0,9	0,8
C30:0	0,0	0,0	3,9	11,1	11,8	14,5	13,7	15,5	12,9	13,3
C32:0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	6,4	6,3	8,1	6,1	6,4
C34:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,6	0,0	0,0
Teores										
Álcoois Totais	77,7%	61,9%	34,1%	29,4%	31,1%					
Ácidos Totais	2,1%	0,6%	10,0%	11,6%	11,9%					
NI	6,7%	5,7%	3,0%	0,9%	1,4%					

* Derivatizado segundo Hartman e Lago (1973) nas condições do Teste E (saponificação 60', esterificação 40'). ** Derivatizado segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008). *** Concentrado de álcoois graxos obtido em escala laboratorial, derivatizado segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008). Ensaio 3 (saponificação 15', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:5, 1:3, 1:3); Ensaio 4 (saponificação 90', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 5 (saponificação 90', 1 extração – relação cera:EtOH - 1:5). NI: Não Identificados

Tabela A.4 - Composição e concentração em ácidos e álcoois graxos dos concentrados de ácidos graxos da cera de cana-de-açúcar obtidos em escala laboratorial, derivatizados segundo Mendez, Marrero e Canavaciolo (2008)

Componente	Composição (%)			
	Ácidos		Álcoois	
	Concentrado de ácidos graxos Ensaio 4	Concentrado de ácidos graxos Ensaio 5	Concentrado de ácidos graxos Ensaio 4	Concentrado de ácidos graxos Ensaio 5
C16:0	15,6	20,2	-	-
C18:3	0,6	0,0	-	-
C18:1 e C18:2	2,7	3,7	-	-
C18:0	3,6	3,7	-	-
C20:0	1,6	1,7	-	-
C22:0	2,4	2,6	-	-
C24:0	5,3	5,4	5,8	6,3
C26:0	4,1	4,1	11,2	12,0
C27:0	6,3	5,3	2,6	2,8
C28:0	30,7	28,0	59,4	59,0
C29:0	3,4	3,2	0,0	0,0
C30:0	11,9	11,5	13,5	13,2
C32:0	6,3	5,9	7,4	6,7
C34:0	5,6	4,7	0,0	0,0
Teores				
Álcoois Totais	12,1%	12,1%		
Ácidos Totais	29,0%	25,1%		
NI	3,6%	2,6%		

Ensaio 4 (saponificação 90', 3 extrações – relação cera:EtOH - 1:3, 1:2, 1:2); Ensaio 5 (saponificação 90', 1 extração – relação cera:EtOH - 1:5). NI: Não Identificados.