



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

JULCELLY DAYARA DE OLIVEIRA HENRIQUES

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE POLICOSANOL A
PARTIR DA CERA DA CASCA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

CAMPINAS

2021

JULCELLY DAYARA DE OLIVEIRA HENRIQUES

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE POLICOSANOL A
PARTIR DA CERA DA CASCA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Fazzio Martins Martinez.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JULCELLY DAYARA DE OLIVEIRA HENRIQUES, E ORIENTADA PELA PROF.^A DR.^A PATRICIA FAZZIO MARTINS MARTINEZ

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

C395d Henriques, Julcelly Dayara de Oliveira, 1991-
Desenvolvimento de processo para obtenção de policosanol a partir da
cera da casca da cana-de-açúcar / Julcelly Dayara de Oliveira Henriques. –
Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Patricia Fazzio Martins Martinez.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Cana-de-açúcar. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Cromatografia em
coluna. 4. Policosanol. 5. Octacosanol. 6. Ceras. I. Martinez, Patricia Fazzio
Martins, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Process development for policosanol obtention from sugarcane
peel wax

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane

Agro-industrial waste

Chromatographic columns

Policosanol

Octacosanol

Waxes

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Patricia Fazzio Martins Martinez [Orientador]

Leonardo Vasconcelos Fregolente

Vera Lucia Garcia

Andrea Komesu

Gláucia Maria Ferreira Pinto

Data de defesa: 21-07-2021

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9247-5115>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9473184767359641>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese de Doutorado defendida por Julcelly Dayara de Oliveira Henriques em 21 de julho de 2021 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:

Profa. Dra. Patricia Fazzio Martins Martinez
Presidente e Orientadora
Faculdade de Engenharia Química - FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Leonardo Vasconcelos Fregolente
Faculdade de Engenharia Química - FEQ/UNICAMP

Dra. Vera Lucia Garcia
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas -
CPQBA/UNICAMP

Profa. Dra. Andrea Komesu
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/Santos

Profa. Dra. Gláucia Maria Ferreira Pinto
Centro Universitário de Paulínia - UNIFACP

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em sua infinita bondade por todas as bênçãos a mim concedidas, por guiar a minha vida, proteger o meu caminho, me amparar nas adversidades e preencher meu coração com a certeza de que nunca estou sozinha.

Aos meus pais Celi e Julmar, e ao meu irmão Stênio, pelo carinho e amor incondicional dedicados em todos esses anos, pelo apoio, incentivo compreensão e por serem tão presentes apesar da distância. Agradeço também à todos os meus familiares por teremorado e vibrado comigo a cada vitória.

Ao meu esposo Antonione, por todo o amor, carinho, apoio, dedicação, estímulo e principalmente por não me deixar duvidar da minha capacidade e estar ao meu lado em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Patricia Fazzio Martins Martinez, pelo voto de confiança a mim concedido ao aceitar ser minha orientadora. Sou muito grata pela boa relação que sempre tivemos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação, suporte, incentivo e pelos valiosos ensinamentos ao longo desta jornada que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os colegas de laboratório, em especial a Renata, Felipe, Gabriel, Pedro e Thalyta, pela troca de conhecimentos e experiências, companheirismo no dia-a-dia, pela ajuda e pelos bons momentos de descontração compartilhados.

Aos queridos amigos Renata, Thaynara, Kathlen, Filipe, Mariana, Letícia, Fernanda e Rafael que estiveram presentes nesta jornada, principalmente pelo acolhimento, companheirismo, apoio e pelos momentos de alegrias e frustrações compartilhados. Agradeço também aos demais amigos que não foram citados por todo o carinho e incentivo.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) por disponibilizar o acesso e uso da estrutura e equipamentos fundamentais para a realização dos experimentos.

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Adilson Sartoratto pelo inestimável auxílio nas análises por CG-EM, pelas discussões frutíferas, dedicação, disponibilidade de dividir os seus valiosos conhecimentos e amizade firmada.

Agradeço também à Dr^a. Carmen Lucia Queiroga por ter aceitado este desafio que mostrou ser muito maior do que imaginávamos. Sou muito grata por toda a ajuda que me foi dada durante a minha estadia no CPQBA, pelas discussões, apoio, dedicação, amizade e pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para o meu amadurecimento acadêmico e pessoal. Sem a sua contribuição não teria sido possível concluir este trabalho. Meu muito obrigada!

A todos os integrantes do Laboratório de Equilíbrio de Fases (LEF) e à Prof^a. Dr^a. Mariana Conceição da Costa por abrirem as portas do laboratório e colocarem à minha disposição todos os recursos físicos e humanos disponíveis para realização de parte dos experimentos. O meu muito obrigada por toda a ajuda, suporte e amizade.

À empresa Garuda International, Inc. pela doação do Lesstanol[®].

À Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pela infraestrutura, e a todos os funcionários, que de forma direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também aos técnicos do Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) pela realização de análises fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Aos membros que aceitaram compor as bancas avaliadoras pela compreensão, disponibilidade e valiosas contribuições.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida (Processo 140928/2017-0).

A todos aqueles que direta ou indiretamente, participaram e contribuíram para essa conquista e para a minha formação pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O policosanol é uma mistura de álcoois graxos de cadeia longa (C₂₀-C₃₄) que apresenta efeitos benéficos na promoção da saúde, devido as suas atividades antioxidantes, antiplaquetárias e anticolesterolêmicas. A principal fonte dessa mistura são as ceras vegetais; entre elas, a cera da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), que tem grande destaque no Brasil devido ao expressivo número de hectares plantados no território nacional. Apesar disto, ainda não há produção de policosanol no Brasil. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo para a obtenção de policosanol a partir da cera oriunda da casca proveniente da raspagem da cana-de-açúcar destinada aos garapeiros. O teor de policosanol foi monitorado a partir da quantificação de octacosanol (C₂₈), que é o álcool graxo majoritário. Inicialmente, a cera foi extraída com hexano e purificada, apresentando 29,7% de octacosanol. Na sequência, a cera foi submetida a diferentes métodos de purificação, como reações de hidrólise, partição líquido-líquido e fracionamento por coluna cromatográfica (seca e *flash*), visando aumentar o teor de policosanol. A hidrólise dos ésteres foi realizada no intuito de promover a liberação dos álcoois graxos livres, contribuindo para aumentar a concentração destes constituinte na cera; entretanto, o alto teor de ácidos graxos livres induziu a ocorrência de reações paralelas, comprometendo o rendimento da reação e inviabilizando o seu uso nas etapas subsequentes. No intuito de utilizar a cromatografia contracorrente (HSCCC) para fracionar os constituintes da cera, foram realizados testes de partição líquido-líquido empregando diferentes solventes, no entanto, a baixa solubilidade da cera nos sistemas de solventes avaliados inviabilizou o uso desta tecnologia. A partir do fracionamento da cera por coluna cromatográfica seca, foram obtidas frações com teor de octacosanol variando de 11 a 44%, sendo observada também a retenção de parte dos ácidos junto aos álcoois graxos. A cromatografia *flash* em coluna com sílica gel impregnada com KOH foi empregada a fim de reter os componentes ácidos na coluna e possibilitou a obtenção de frações com teor de octacosanol superior a 50%, aproximando-se do produto comercial Lesstanol®. O presente trabalho conseguiu promover o reaproveitamento de um resíduo agroindustrial para a obtenção de um produto de maior valor agregado (policosanol), a partir de uma técnica de fracionamento simples, eficaz, rápida e de baixo custo, contribuindo assim para o avanço de pesquisas relacionadas à purificação do policosanol.

Palavras chave: cana-de-açúcar, resíduo agroindustrial, cera, colunas cromatográficas, policosanol, octacosanol, aterosclerose.

ABSTRACT

Policosanol is a mixture of long-chain fatty alcohols (C₂₀-C₃₄) that has beneficial health-promoting effects due to its antioxidant, antiplatelet and anticholesterolemic activities. The main source of this mixture is vegetable waxes; among them, sugarcane wax (*Saccharum officinarum* L.) has great prominence in Brazil due to the expressive number of planted hectares in the national territory. Despite this, there is still no production of policosanol in Brazil. In this sense, the objective of this work was to develop a process for the policosanol obtainment from the wax that comes from cane scraping for sugarcane juice production. The policosanol content was monitored through the quantification of octacosanol (C₂₈), the predominant alcohol in the mixture. Firstly, the wax extraction by hexane and purification were performed, which presented 29.7% of octacosanol. Subsequently, the wax was subjected to different purification methods, such as hydrolysis reactions, liquid-liquid partition and fractionation by column chromatography (dry and flash), in order to increase the policosanol content. The hydrolysis of the esters was carried out in order to promote the free fatty alcohols release, contributing to increase the concentration of these constituents in the wax; however, the high content of free fatty acids induced the occurrence of parallel reactions, compromising the reaction yield and making unfeasible its use in subsequent steps. In order to use counter-current chromatography (HSCCC) to fractionate the wax constituents, liquid-liquid partition tests were carried out using different solvents; however, the wax low solubility in the evaluated solvent systems made the use of this technology unfeasible. From the wax fractionation by dry chromatographic column, fractions with octacosanol content ranging from 11 to 44% were obtained, being also observed the retention of acids with the fatty alcohols. Flash column chromatography with KOH impregnated silica was employed in order to retain the acidic components in the column and, made it possible to obtain fractions with an octacosanol content greater than 50%, approaching the commercial product Lesstanol[®]. Thus, the present work was able to promote the reuse of an agro-industrial waste to obtain a higher value-added product (policosanol), from a simple, effective, fast and low-cost fractionation technique, contributing to the advancement of research related to the policosanol purification.

Keywords: sugarcane, agro-industrial waste, wax, chromatographic columns, policosanol, octacosanol, atherosclerosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Visão geral do trabalho	21
Figura 2.1 - Classificação das ceras de acordo com sua origem.....	28
Figura 2.2 - Estimativa da demanda global de ceras de acordo com sua aplicação	30
Figura 2.3 - Produtos, coprodutos, subprodutos e potenciais derivados da agroindústria da cana-de-açúcar	31
Figura 2.4 - Raspador e limpador de cana-de-açúcar	33
Figura 2.5 - Cera aderida à casca da cana-de-açúcar.....	34
Figura 2.6 - Benefícios do policosanol e possíveis mecanismos de ação.....	43
Figura 2.7 - Policosanol comercial	44
Figura 2.8 - Aterosclerose	45
Figura 2.9 - Estrutura genérica dos álcoois graxos	46
Figura 2.10 - Representação genérica da reação de silição	52
Figura 2.11 - Éster de cera.....	53
Figura 2.12 - Reação de esterificação.....	53
Figura 2.13 - Reações de hidrólise.....	54
Figura 3.1 - Esquema resumido das etapas para a obtenção do policosanol.....	66
Figura 3.2 - Secagem da casca da cana-de-açúcar	67
Figura 3.3 - Sistema Soxhlet utilizado para a extração da cera da casca da cana-de-açúcar	69
Figura 3.4 - Procedimento de purificação da cera bruta	77
Figura 3.5 - Fluxograma do processo de obtenção do policosanol.....	79
Figura 3.6 - Representação esquemática das etapas de transesterificação ácida em metanol	80
Figura 3.7 - Esquema do procedimento dos testes de partição líquido-líquido	81
Figura 3.8 - Procedimento de complexação com ureia.....	83
Figura 3.9 - Procedimento de fracionamento da cera por cromatografia em coluna seca ...	85
Figura 3.10 - Procedimento de fracionamento da cera por cromatografia em coluna flash .	86
Figura 3.11 - Procedimento de derivatização (metilação).....	88
Figura 4.1 - (a) Distribuição do tamanho médio e, (b) frequência acumulada das partículas passantes da casca da cana-de-açúcar	91
Figura 4.2 - Massa dos extratos resultantes da extração exaustiva	92
Figura 4.3 - Rendimento bruto (r) da extração exaustiva da cera em função do tempo e da vazão de solvente	93
Figura 4.4 - Cera bruta da cana-de-açúcar	94
Figura 4.5 - Cera purificada da cana-de-açúcar	95
Figura 4.6 - Imagens capturadas pela microscopia óptica (100x a 30 °C) da solubilidade da cera bruta da cana-de-açúcar em diferentes solventes	100
Figura 4.7 - Comportamento de solubilidade da cera de cana-de-açúcar em limoneno(—) e terebentina(—).....	101
Figura 4.8 - Espectros do FTIR da cera bruta analisada no modo ATR (—) e por transmitância (pastilha de KBr) (—)	102
Figura 4.9 - Espectros do FTIR da cera bruta (—) e purificada (—)	103
Figura 4.10 - Espectros do FTIR da cera bruta da cana de açúcar (—) e das ceras comerciais de candelila (—) e carnaúba (—)	105
Figura 4.11 - DSC de fusão da cera bruta da cana-de-açúcar (—) e das ceras comerciais de candelila (····) e carnaúba (----).....	106

Figura 4.12 - DSC de (a) fusão e (b) solidificação da cera purificada sob diferentes condições de análise	108
Figura 4.13 - DSC de (a) fusão e (b) solidificação da cera bruta (—) e purificada (—) da cana-de-açúcar	109
Figura 4.14 - Termogramas das ceras (a) bruta (—) e purificada (—) da cana-de-açúcar, além das ceras comerciais de (b) carnaúba (—) e candelila (—)	110
Figura 4.15 - Cromatograma da cera purificada após (a) metilação e (b) sililação	112
Figura 4.16 - Cromatograma do Lesstanol [®] sililado	113
Figura 4.17 - Cromatogramas das ceras (a) bruta e (b) purificada sililadas	115
Figura 4.18 - Espectro de massas do (a) octacosanol sililado (MM 482) e (b) octacosanol (MM 410) (NIST-11)	116
Figura 4.19 - Padrão de fragmentação comum aos aldeídos	118
Figura 4.20 - Padrão de fragmentação do dotriacontanal (MM 464) com perda de uma molécula de H ₂ O (m/z 446)	118
Figura 4.21 - Cromatograma da cera da cana-de-açúcar sililada de referência	119
Figura 5.1 - Produto da reação de transesterificação alcalina	121
Figura 6.1 - Partição líquido-líquido da cera purificada	124
Figura 6.2 - Análise por CCD do teste de partição com o sistema E4 (a) antes e (b) após aquecimento	125
Figura 7.1 - Estrutura cristalina (a) tetragonal e (b) hexagonal da ureia [(NH ₂) ₂ CO]	126
Figura 7.2 - Análise por CCD das frações após complexação com ureia	127
Figura 7.3 - Análise por CCD da cera de abelha	128
Figura 7.4 - Coluna seca com marcação das frações	129
Figura 7.5 - Análise por CCD das frações da coluna seca	130
Figura 7.6 - Análise por CCD de frações da coluna <i>flash</i> da cera purificada	132
Figura 7.7 - Análise por CCD de frações da coluna <i>flash</i> da cera bruta	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Aplicação de cera vegetal purificada	30
Tabela 2.2 - Composição química da cana-de-açúcar.....	32
Tabela 2.3 - Composição da cera bruta da cana-de-açúcar	35
Tabela 2.4 - Rendimentos de cera bruta da cana-de-açúcar a partir de diferentes matérias-primas e solventes	37
Tabela 2.5 - Composição da cera purificada da cana-de-açúcar	40
Tabela 2.6 - Diferentes fontes naturais de policosanol e octacosanol.....	41
Tabela 2.7 - Teor de octacosanol dentre os álcoois graxos existentes na cana-de-açúcar..	42
Tabela 2.8 - Propriedades físico-químicas de álcoois graxos de C ₂₀ a C ₃₀	46
Tabela 3.1 - Condições para análise de DSC	76
Tabela 4.1 - Índices analíticos da cera bruta da cana-de-açúcar	95
Tabela 4.2 - Parâmetros físico-químicos da cera purificada da cana-de-açúcar	97
Tabela 4.3 - Propriedades físico-químicas de diferentes ceras comerciais.....	98
Tabela 4.4 - Solubilidade parcial da cera bruta da cana-de-açúcar	99
Tabela 4.5 - Análise de componentes de banda dos espectros de FTIR da cera da cana-de-açúcar.....	103
Tabela 4.6 - Temperaturas e entalpias de fusão e solidificação da cera purificada sob diferentes condições de análise	108
Tabela 4.7 - Analitos presentes no Lesstanol® sililado.....	114
Tabela 4.8 - Analitos presentes na cera bruta sililada.....	116
Tabela 4.9 - Analitos presentes na cera purificada sililada	117
Tabela 5.1 - Resultados obtidos das reações de clivagem dos ésteres da cera purificada	120
Tabela 6.1 - Teste de partição líquido-líquido	123
Tabela 7.1 - Teores de octacosanol sililado contidos nas frações da coluna seca por CG-EM	130
Tabela 7.2 Teores de octacosanol sililado contido nas frações da coluna flash da cera purificada por CG-EM	133
Tabela 7.3 - Teores de octacosanol sililado contido nas frações da coluna flash da cera bruta por CG-EM.....	135
Tabela 7.4 - Porcentagens relativas dos constituintes das frações 5 das colunas flash com cera purificada e bruta, além da mistura de álcoois graxos (Lesstanol®).....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL - Ácidos Graxos Livres

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOCs - *American Oil Chemists' Society*

APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionização Química a Pressão Atmosférica)

ATR - Modo de Refletância Total Atenuada

AVC - Acidente Vascular Cerebral

CCC - Cromatografia Contracorrente

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG - Cromatografia a Gás

CG-EM - Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

EM - Espectrometria de Massas

ELSD - *Evaporative Light Scattering Detector* (Detector de Dispersão de Luz Evaporativo)

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HPLC-MS - *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas)

HPTLC - *High Performance Thin Layer Chromatography* (Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência)

HSCCC - *High Speed Counter-Current Chromatography* (Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade)

HT-GC-MS - *High Temperature-Gas Chromatography Mass Spectrometry* (Cromatografia Gasosa de Alta Temperatura Acoplada a Espectrometria de Massas)

FTIR - *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier)

HDL - *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Alta Densidade)

IA - Índice de Acidez

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

II - Índice de Iodo

IS - Índice de Saponificação
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
K_D - Coeficiente de Partição
LDL - *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LT - Lipídios Totais
MI - Índice de Matéria Insaponificável
MM - Massa Molecular
MS - *Mass spectrometry*
MSTFA - *N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide*
NIST - *National Institute of Standards and Technology*
OM - Microscopia Óptica
PA - Padrão Analítico
PF - Ponto de Fusão
PTFE - Politetrafluoroetileno
R_f - Coeficiente de Retenção
TGA - Análise Termogravimétrica
TLC - *Thin Layer Chromatography*
USP - *United States Pharmacopoeia*
UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

Capítulo 1	18
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	18
1.1. INTRODUÇÃO	18
1.2. OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo Geral	20
1.2.2 Objetivos Específicos	20
1.3 ORGANIZAÇÃO DA TESE	21
1.4. ALTERAÇÕES DA PROPOSTA INICIAL	23
1.5. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	24
Capítulo 2	27
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Ceras	27
2.2 Cana-de-açúcar	31
2.2.1 Cera da cana-de-açúcar	34
2.2.1.1 Extração	35
2.2.1.2 Purificação	38
2.3 Policosanol	40
2.3.1 Fontes de policosanol	40
2.3.2 Efeitos do policosanol na promoção da saúde	42
2.3.2.1 Doenças ateroscleróticas	44
2.3.3 Propriedades físico-químicas	45
2.3.4 Obtenção e análise do policosanol	47
2.4 Métodos alternativos para a purificação do policosanol	53
2.4.1 Reações de clivagem do éster	53
2.4.1.1 Transesterificação	54
2.4.1.1.1 Catálise alcalina	55
2.4.1.1.2 Catálise ácida	57
2.4.2 Cromatografia contracorrente	58
2.4.2.1 Uso de cromatografia em camada delgada para a determinação do perfil cromatográfico de ceras	61
2.4.3 Cromatografia em coluna	63
2.5 Considerações finais	65

Capítulo 3.....	66
MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
3.1 Matéria-Prima	67
3.1.1 Caracterização	67
3.1.1.1 Distribuição granulométrica	68
3.1.1.2 Teor de umidade.....	68
3.1.1.3 Teor de lipídios totais.....	68
3.2 Extração da cera bruta.....	69
3.2.1 Extração exaustiva	70
3.3 Caracterização das ceras	71
3.3.1 Índices Analíticos	71
3.3.1.1 Índice de Acidez e Ácidos Graxos Livres.....	71
3.3.1.2 Índice de Saponificação.....	72
3.3.1.3 Índice de Iodo	73
3.3.1.4 Índice de Matéria Insaponificável	73
3.3.2 Espectroscopia no FTIR.....	74
3.3.3 Solubilidade por microscopia óptica (OM).....	75
3.3.4 Propriedades térmicas	75
3.3.4.1 Calorimetria exploratória diferencial	75
3.3.4.2 Análise termogravimétrica	76
3.4 Purificação	77
3.5 Reações de clivagem do éster.....	78
3.6 Ensaio de partição líquido-líquido	81
3.7 Técnicas de Fracionamento por cromatografia em coluna e complexação com ureia.....	82
3.7.1 Complexação com ureia.....	82
3.7.2 Cromatografia em coluna	84
3.7.2.1 Cromatografia em coluna seca	84
3.7.2.2 Cromatografia em coluna <i>flash</i>	85
3.8 Identificação do octacosanol.....	86
3.8.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	86
3.8.2 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas	87
3.8.2.1 Derivatização	87

3.8.2.2 Condições da CG-EM.....	88
3.8.2.2.1 Identificação dos constituintes.....	88
3.8.2.2.2 Curva de calibração	89
Capítulo 4.....	90
EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÕES	90
4.1 Caracterização da matéria-prima.....	90
4.1.1 Distribuição granulométrica.....	90
4.1.2 Teor de umidade e lipídios totais.....	91
4.2 Extração e purificação da cera	92
4.2.1 Extração exaustiva	92
4.2.2 Purificação	94
4.3 Caracterização da ceras bruta e purificada	95
4.3.1 Índices analíticos.....	95
4.3.2 Solubilidade da cera bruta.....	99
4.3.3 Espectroscopia no FTIR.....	101
4.3.4 Propriedades térmicas	105
4.3.4.1 Calorimetria exploratória diferencial	105
4.3.4.2 Análise termogravimétrica	110
4.4 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas	111
4.4.1 Derivatização	111
4.4.2 Análise da mistura comercial de álcoois graxos (Lesstanol®)	113
4.4.3 Análise da composição das ceras bruta e purificada	114
Capítulo 5.....	120
REAÇÕES DE CLIVAGEM DOS ÉSTERES	120
Capítulo 6.....	123
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE SOLVENTES PARA PARTIÇÃO LÍQUIDO- LÍQUIDO DA CERA PURIFICADA.....	123
Capítulo 7.....	126
COMPLEXAÇÃO COM UREIA E FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNAS.....	126
7.1 Remoção de ácidos graxos por complexação com ureia.....	126
7.2 Cromatografia em colunas.....	129
7.2.1 Coluna seca	129

7.2.2 Coluna <i>flash</i>	131
Capítulo 8	138
CONCLUSÃO	138
Capítulo 9	140
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	140
REFERÊNCIAS	141
APÊNDICE A - Curvas de calibração do padrão octacosanol para CG-EM.....	170
APÊNDICE B - FTIR e DSC do padrão octacosanol.....	171
APÊNDICE C - Especificação do Lesstanol®	172
APÊNDICE D - Espectros de massas	173

Capítulo 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

As doenças isquêmicas como o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e o Acidente Vascular Cerebral (AVC) são as principais causas de morte em todo o mundo, contabilizando um total de 8,9 milhões de mortes só no ano de 2019 e, com estimativa de 400 mil óbitos no Brasil até o fim de 2021 (WHO, 2020; SBC, 2021). Estas isquemias são normalmente desencadeadas pelo bloqueio das artérias que transportam o oxigênio através do sangue para o coração e o cérebro, que é comumente causado pela doença vascular crônica aterosclerose. Os elevados níveis de colesterol no sangue representam um dos fatores predisponentes das doenças ateroscleróticas (SBC, 2017).

Dentre as alternativas existentes para diminuir os índices de colesterol no sangue, tem-se destaque a utilização de uma mistura de álcoois alifáticos de cadeia longa, denominada policosanol, que possui propriedades antiviral, anti-inflamatória, anti-úlceras antibacteriana, antiplaquetária antioxidante, antilipemiante, anticolesterolêmica, dentre outros (Carbajal et al., 1995; Taylor et al., 2003; Leal, 2006; Feng et al., 2015; Marinangeli et al., 2010), com efeitos confirmados por mais de 50 estudos clínicos e com aprovação de seu uso como medicamento redutor de colesterol em mais de 25 países em todo o Caribe e na América do Sul (Viola et al., 2008; Marinangeli et al., 2010; Ishaka et al., 2014; Lukic et al., 2015). No Brasil, o policosanol é utilizado como produto farmacêutico ou suplemento alimentar. Por ser utilizado como suplemento alimentar com concentração máxima de 40 mg, o policosanol é isento de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010).

O policosanol é caracterizado por uma mistura de álcoois alifáticos (C₂₀-C₃₄), sendo composto majoritariamente por octacosanol (C₂₈). Por ser encontrado em maiores concentrações dentre os álcoois (17,9 - 87,8%) (Irmak et al., 2006; Asikin et al., 2012; Attard et al., 2015), acredita-se que o octacosanol seja o principal responsável pela eficácia do uso do policosanol na diminuição dos índices de colesterol no sangue, à medida em que atua inibindo as etapas iniciais da biossíntese do colesterol endógeno e aumentando o catabolismo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Castaño et al., 2000; Marinangeli et al., 2010; Weerawatanakorn et al., 2017).

A mistura de álcoois graxos é comumente obtida a partir do isolamento de fontes naturais como cera de abelha e cochonilha, cera do farelo do arroz e cana-de-açúcar; além dos óleos de trigo, azeitona, milho, amendoim, girassol, canola, açafrão, soja, tomate, brócolis, espinafre, chá-verde, gergelim, uva, cardo mariano, dentre outros (Jung et al., 2011; Ishaka et al., 2014; Sharma et al., 2019).

Os materiais lipídicos nos quais o policosanol pode ser encontrado são compostos também por outros constituintes em maiores proporções, como ácidos graxos e ésteres de cera. A forma mais comum de obtenção do policosanol é a partir do isolamento de fontes naturais por extração com solventes orgânicos, seguida das etapas de purificação, clivagem de ésteres e extração líquido-líquido (Ou et al., 2012; Feng et al., 2015). Entretanto, a obtenção do policosanol a partir do emprego de reações de clivagem apresenta limitações relacionadas à extração e separação do policosanol.

Além deste método tradicional, há relatos também da obtenção de policosanol (octacosanol) encontrado na cera da cana-de-açúcar a partir de métodos alternativos como extração supercrítica (61,4 - 220,8 mg.100g⁻¹) (Attard et al., 2015), extração assistida por ultrassom (27,0 mg.100g⁻¹) (Irmak et al., 2006), destilação molecular (rendimento de policosanol e teor de octacosanol de 27,7% e 57,9%, respectivamente) (Lopes, 2010), extração por solvente pressurizado, dentre outros (Shen et al., 2019).

Como a similaridade entre as estruturas moleculares dos álcoois e ácidos graxos, e por consequência, de suas propriedades físico-químicas, incluindo a solubilidade, dificultam a separação do policosanol, a utilização de técnicas de separação eficientes e que são amplamente empregadas para o isolamento e purificação de diferentes produtos naturais, como o fracionamento por colunas e cromatografia contracorrente, podem ser uma alternativa potencial para a obtenção de policosanol (octacosanol).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das principais fontes de policosanol e também uma das culturas agrícolas mais importantes para o Brasil, sendo este o maior produtor mundial, com estimativa de produção de 628,1 milhões de toneladas na safra de 2021/2022 (CONAB, 2021). A colheita e o processamento da cana-de-açúcar estão associados a geração de grandes volumes de subprodutos, como folha, casca, bagaço e torta do filtro rotativo. Entretanto, alguns destes subprodutos podem ainda ser processados a fim de promover a valorização dos mesmos através da obtenção de produtos de maior valor agregado, como é o caso da cera obtida a partir da casca e torta do filtro rotativo (Inarkar e Lele, 2012).

A casca da cana-de-açúcar apresenta-se como uma excelente alternativa para a obtenção da cera, já que é a porção mais abundante da mesma. Embora seja gerada em menor volume, quando comparada à torta do filtro rotativo, a obtenção de cera a partir da casca da cana-de-açúcar apresenta-se como um processo de escalonamento viável, já que o maior produtor de cana-de-açúcar destinada para a produção de garapa do Estado de São Paulo (o município de Cajuru), produz diariamente 20 toneladas de cana-de-açúcar (Quartier, 2014), o que seria suficiente para a obtenção diária de 200 kg de cera bruta, suprimindo uma pequena parcela da demanda global de cera (3025 kt) utilizada para diferentes aplicações (Wei, 2012). Logo, como o Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar, o mesmo apresenta-se também como um potencial fornecedor de sua cera, e conseqüentemente, de policosanol. Apesar disto, ainda não há produção brasileira de policosanol.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar a obtenção do policosanol encontrado na cera da casca da cana-de-açúcar a partir de reações de clivagem, cromatografia contracorrente e purificação por colunas cromatográficas. Neste sentido, foi aproveitado um resíduo agroindustrial para a obtenção do policosanol, possibilitando produzi-lo de forma mais ampla no Brasil; viabilizando ainda mais o avanço de pesquisas relacionadas à purificação do policosanol a partir de ceras e, o desenvolvimento de estudos clínicos e farmacológicos associados à sua utilização no tratamento de doenças ateroscleróticas e, conseqüente redução nos gastos com a saúde pública associados ao tratamento destas doenças.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar diferentes técnicas de purificação a fim de desenvolver tecnologia para a obtenção de policosanol (octacosanol) a partir da cera da casca da cana-de-açúcar.

1.2.2 Objetivos Específicos

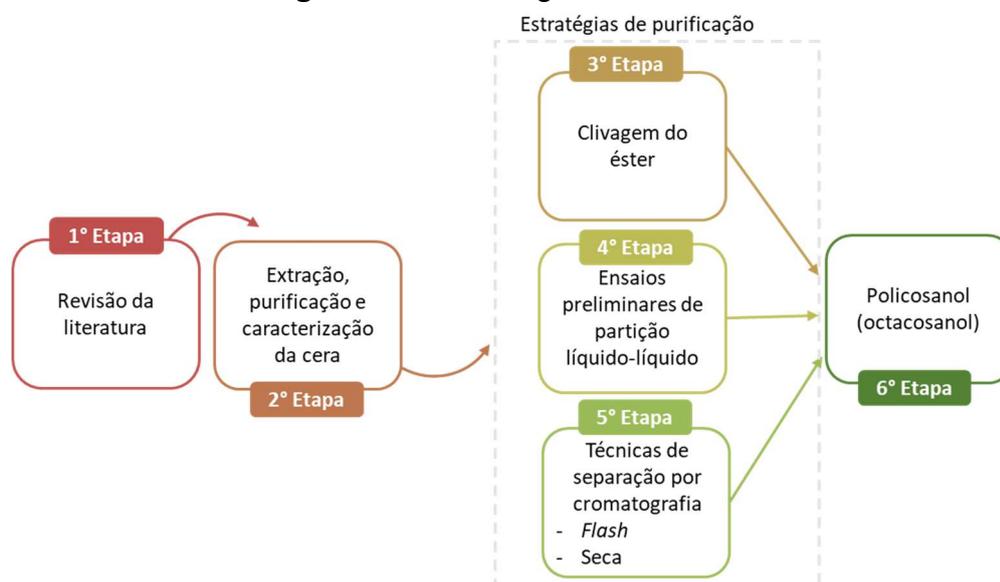
Para atender ao propósito deste estudo, foi necessário desenvolver alguns objetivos específicos:

1. Definir a melhor condição de extração da cera a partir da casca da cana-de-açúcar.

2. Caracterizar as amostras de cera bruta e purificada em relação as suas propriedades físico-químicas e térmicas.
3. Avaliar diferentes metodologias de clivagem de ésteres de cera descritas na literatura.
4. Realizar testes preliminares de partição líquido-líquido da cera visando identificar o sistema de solventes bifásicos mais adequado para conduzir testes de cromatografia contracorrente (HSCCC).
5. Estudar a purificação do policosanol (octacosanol) contido na cera a partir do fracionamento por colunas cromatográficas (*seca* e *flash*).
6. Avaliar a melhor estratégia de separação e purificação (reações de clivagem, partição líquido-líquido e cromatografia em coluna) de policosanol em termos do teor (%), concentração ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de cera) e rendimento de octacosanol ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de casca da cana-de-açúcar).

A visão geral deste trabalho é apresentada na Figura 1.1.

Figura 1.1 - Visão geral do trabalho



1.3 ORGANIZAÇÃO DA TESE

Este trabalho foi organizado de forma sistemática e dividido em forma de 9 capítulos, com os seguintes assuntos:

No Capítulo 1 foi apresentada a introdução acerca dos principais tópicos explorados neste trabalho que contemplam o uso do policosanol (octacosanol) como uma alternativa na redução dos índices de colesterol, que é um fator predisponente

de doenças ateroscleróticas. Também foram abordadas as principais fontes de policosanol, que compreendem principalmente ceras de origem vegetal, dando ênfase a cera da cana-de-açúcar, que é composta majoritariamente por ésteres, ácidos e álcoois graxos; além de diferentes formas de obtenção, o que inclui a clivagem dos ésteres de cera para a obtenção de álcoois livres, evidenciando ainda a necessidade e dificuldade de se separar estes constituintes, de modo a situar o leitor sobre o problema abordado e justificando a contribuição e importância deste estudo. Os objetivos geral e específicos também foram apresentados neste capítulo.

No Capítulo 2, é apresentada a uma extensa revisão bibliográfica acerca da importância do controle de doenças ateroscleróticas e a possibilidade de fazer tal controle a partir do uso de uma mistura de álcoois graxos de cadeia longa (policosanol) encontrada em ceras vegetais. Apresenta também como a utilização de casca de cana-de-açúcar para a produção de cera pode ser uma excelente alternativa de agregar valor a este resíduo agroindustrial, destacando-se os diversos métodos e alternativas de obtenção e purificação do policosanol, como reações de clivagem dos ésteres, cromatografia em colunas, cromatografia contracorrente, dentre outros.

No Capítulo 3, apresenta-se a metodologia adotada, materiais, descrição dos equipamentos e informações necessárias para conduzir os ensaios experimentais.

No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados de caracterização da casca da cana-de-açúcar, os rendimentos obtidos a partir da extração e purificação da cera, além da caracterização (em termos dos índices analíticos, espectro de absorção no infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, análise termogravimétrica, solubilidade e teor de octacosanol) destas amostras.

No Capítulo 5 estão apresentados os resultados das reações de clivagem dos ésteres a partir de diferentes metodologias de hidrólise descritas na literatura. O objetivo desta etapa foi o de aumentar a quantidade de álcoois livres (em termos do octacosanol), para então serem conduzidas as etapas subsequentes deste trabalho.

No intuito de definir um sistema de solventes a ser utilizado na cromatografia contracorrente (HSCCC) para o fracionamento dos constituintes da cera purificada (ésteres, ácidos e álcoois graxos), foram realizados testes preliminares de partição líquido-líquido com sistemas de solventes bifásicos de diferentes polaridades. Os resultados obtidos a partir destes testes são apresentados no Capítulo 6, sendo que a baixa solubilidade das amostras nos sistemas de solventes bifásicos empregados inviabilizou o uso da técnica de cromatografia contracorrente.

O Capítulo 7 se destina a abordagem de fracionamento dos constituintes da cera da cana-de-açúcar a partir da cromatografia em coluna (seca e *flash*). Na tentativa de avaliar a solubilidade dos constituintes majoritários da cera (ésteres, álcoois e ácidos graxos), neste capítulo foi abordado o resultado do fracionamento da cera purificada por coluna cromatográfica seca, onde foram identificadas frações contendo ésteres, álcoois e ácidos graxos. Visando remover os ácidos graxos presentes na amostra, foi avaliada a complexação com ureia; entretanto este método se mostrou inviável para a obtenção de frações enriquecidas em octacosanol. Foi também explorada a cromatografia em coluna com sílica *flash* impregnada com KOH, com o objetivo de reter os ácidos na coluna e eluir os outros constituintes da cera bruta e purificada.

O Capítulo 8 se destina a apresentação das conclusões obtidas a partir dos resultados deste trabalho, e o Capítulo 9 contém algumas sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros. As referências bibliográficas utilizadas no decorrer do desenvolvimento da tese e os Apêndices são apresentadas após o Capítulo 9.

1.4. ALTERAÇÕES DA PROPOSTA INICIAL

Visto que no grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a. Dr^a. Patricia Fazzio Martins Martinez, tem-se desenvolvido diferentes trabalhos empregando solventes alternativos (como limoneno, terebentina, etanol, propanol e butanol) para a extração da cera da cana-de-açúcar; a proposta inicial desta tese de doutorado era avaliar o uso de misturas de solventes formados por hexano + limoneno, etanol + limoneno, propanol + limoneno e butanol + limoneno para a extração de ceras, uma vez que o uso de misturas de solventes pode ser uma forma alternativa de diminuir o ponto de ebulição (176 °C) de uma solução contendo limoneno. Para a utilização de misturas de solventes, é necessário determinar algumas propriedades termodinâmicas da mistura, como por exemplo o ponto de fulgor (ou *flash point*), que categoriza o risco de inflamabilidade dos produtos.

Dada a dificuldade de se conduzir a extração da cera a partir de misturas de solventes com diferenças significativas de ponto de ebulição entre os componentes individuais, o que requeria o uso de elevadas temperaturas para conduzir a extração e resultava na perda de parte de solvente para a atmosfera assim como a queima do

extrato, optou-se por não dar segmento ao uso destas misturas para conduzir as extrações da cera.

Embora o processo de extração das ceras a partir do uso destas misturas não tenha sido realizado, 7 misturas binárias formadas por d-limoneno com 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-decanol e 1-dodecanol, tiveram as suas densidades (ρ) e volume molar de excesso (V_m^E) determinadas (a 298,15 K); assim também como o seu ponto de fulgor, sendo os valores experimentais destes comparados aos valores calculados utilizando a abordagem de Liaw et al. (2002) e os modelos de coeficiente de atividade UNIQUAC, NRTL, UNIFAC e Ideal.

A determinação destas propriedades e as análises de solubilidade da cera por microscopia óptica (apresentadas no Capítulo 4) foram realizadas no Laboratório de Equilíbrio de Fases (LEF), sob coordenação da Prof^a. Dr^a Mariana Conceição da Costa. A determinação do ponto de fulgor, densidade e volume molar de excesso culminaram com a publicação de um artigo completo em periódico e um trabalho completo em anais de congresso, conforme pode ser observado no item a seguir juntamente com as demais produções obtidas no desenvolver deste trabalho.

1.5. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

Dayara de Oliveira Henriques, Julcelly; Hobi Bordón Sosa, Filipe; Macedo Dias, Rafael; Fazio Martins Martinez, Patricia; Conceição da Costa, Mariana. Flash point and excess molar volumes of binary mixtures containing d-limonene and alcohol compounds from propanol to dodecanol. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 150, p. 106224, 2020.

Henriques, Julcelly Dayara de Oliveira; Oliveira, Renata Maria Araújo; Esteves, Michelli Aparecida Bacetti; Martinez, Patricia Fazio Martins. Extração e purificação da cera da casca de cana-de-açúcar. *Brazilian Journal of Development*, v. 5, p. 18261-18266, 2019.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

Silva, Gabriel Julio da; Henriques, Julcelly Dayara de Oliveira; Martinez, Patricia Fazio Martins. Sugarcane wax extraction using hexane and limonene mixtures. In: *Anais do Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia*. Anais. Diamantina (MG) UFVJM, 2021. Disponível em:

<<https://www.even3.com.br/anais/cobicet/380227-sugarcane-wax-extraction-using-hexane-and-limonene-mixtures>>

Henriques, Julcelly Dayara de Oliveira; Sosa, Filipe Hobi Bordón; Dias, Rafael Macedo; Costa, Mariana Conceição da; Martinez, Patricia Fazzio Martins. Sugarcane wax solubility in terpenic solvents. In: Anais do Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia. Anais. Diamantina (MG) UFVJM, 2021. Disponível em: <<https://www.even3.com.br/anais/cobicet/380377-sugarcane-wax-solubility-in-terpenic-solvents>>

Henriques, J. D. O.; Sosa, F. H. B.; Martinez, P. F. M.; Costa, M. C. Determinação do ponto de fulgor e do volume molar de excesso de misturas binárias contendo D-limoneno. In: X Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada - CBTermo, 2019, Nova Friburgo - RJ. Anais do X Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada - CBTermo, 2019.

Silva, Gabriel Julio; Henriques, Julcelly Dayara de Oliveira; Martinez, Patricia Fazzio Martins. Substituição do Hexano na Extração da Cera da Casca Da Cana de Açúcar. In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2019, Uberlândia. Blucher Chemical Engineering Proceedings. São Paulo: Editora Blucher, 2019. p. 21.

Henriques, J. D. O.; Oliveira, R. M. A.; Esteves, M. A. B.; Martinez, P. F. M. Extração e Purificação da Cera da Casca de Cana-de-Açúcar. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2018, São Paulo. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2018. p. 2633.

Oliveira, R. M. A.; Henriques, J. D. O.; Esteves, M. A. B.; Martinez, P. F. M. Limoneno Como Solvente Alternativo para a Extração da Cera da Cana-de-Açúcar. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2018, São Paulo. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2018. p. 2637.

Artigos em processo de confecção

Oliveira, R. M. A., Henriques, J. D. O., Sartoratto, A.; Maciel, M. R. W., Martinez, P. F. M. Evaluation Of Limonene In Sugar Cane Wax Extraction.

Henriques, J. D. O.; Queiroga, C. L.; Sartoratto, A.; Martinez, P. F. M. Purification of octacosanol from sugarcane wax by column chromatography.

Resumo publicado em anais de congressos

Silva, G. J.; Henriques, J. D. O.; Martinez, P. F. M. Substituição do hexano na extração da cera da casca da cana de açúcar. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2019, Campinas. Anais do XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2019.

Brasil, J. F.; Silva, M. B. R.; Oliveira, M. S.; Silva, V. R. S.; Costa, V. H. R.; Oliveira, R. M. A.; Cremasco, L. F.; Henriques, J. D. O.; Martinez, Patricia Fazzio Martins. Extração da cera do farelo de arroz de maneira mais sustentável. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2018, Campinas. Anais do XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2018.

Resumo publicado em anais de congressos

Oliveira, Renata Maria Araújo; Henriques, J. D. O.; Martinez, P. F. M. Obtenção de octacosanol a partir da utilização de solventes terpênicos. 2019. (Simpósio Internacional Óleos e Gorduras para o Futuro: Próxima Década).

Henriques, J. D. O.; Sosa, F. H. B.; Martinez, P. F. M.; Costa, M. C. Determinação do ponto de fulgor e do volume molar de excesso de misturas binárias contendo D-limoneno. 2019. (X Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada - CBTermo).

Silva, Gabriel Julio; Henriques, Julcelly Dayara de Oliveira; Martinez, Patricia Fazzio Martins. Substituição do hexano na extração da cera da casca da cana de açúcar. 2019. (XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica).

Oliveira, R. M. A.; Henriques, J. D. O.; Esteves, M. A. B.; Martinez, P. F. M. Limoneno como solvente alternativo para a extração da cera da cana-de-açúcar. 2018. (XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química).

Henriques, J. D. O.; Oliveira, R. M. A.; Esteves, M. A. B.; Martinez, P. F. M. Extração e purificação da cera da casca de cana-de-açúcar. 2018. (XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química).

Oliveira, R. M. A.; Melo, E. J.; Henriques, J. D. O.; Esteves, M. A. B.; Moreira, G. G.; Fini, B. G.; Martinez, P. F. M. Seletividade e eficiência de solventes alcoólicos na extração da cera de cana-de-açúcar. 2017. (International Meeting on Fats and Oil Processing: recent advances in trans-fat alternatives).

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

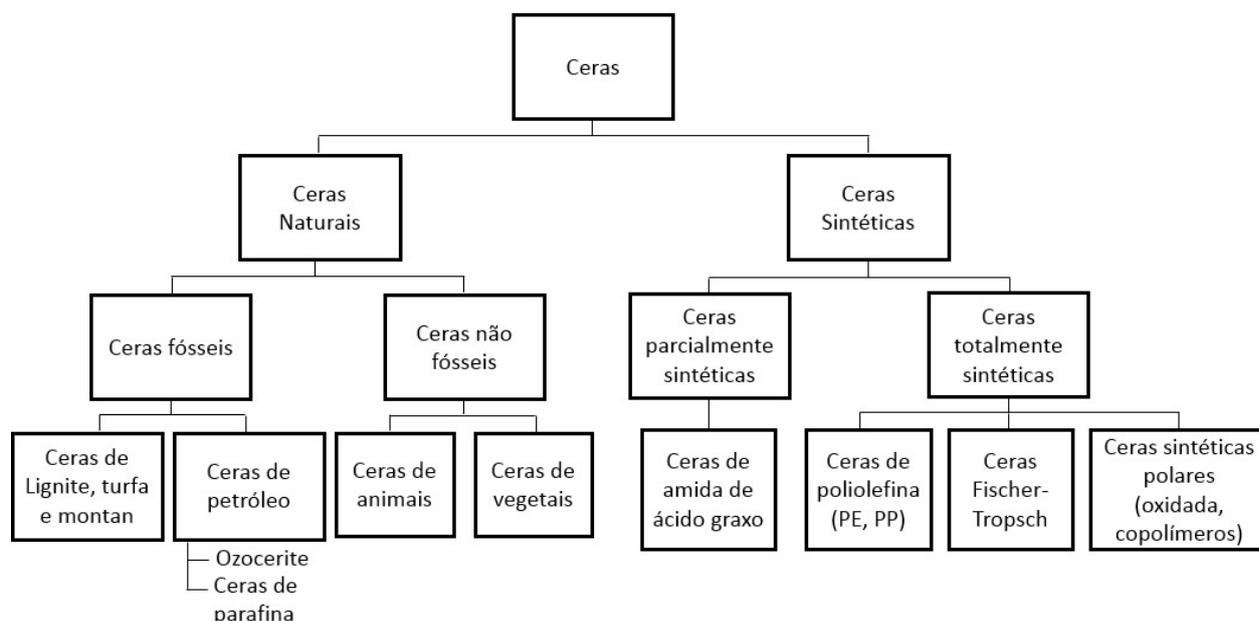
Neste capítulo foi apresentada uma visão geral sobre os principais tópicos relacionados a este estudo, que envolvem a mistura de álcoois graxos (policosanol), assim como suas fontes, formas de obtenção, aplicação (principalmente na redução de doenças ateroscleróticas), além de processos de separação e purificação que apresentam potencial aplicação para o policosanol. Este capítulo também aborda a origem e características da matéria-prima utilizada (casca da cana-de-açúcar), a importância do aproveitamento deste resíduo agroindustrial para a obtenção de ceras e policosanol, além da classificação, aplicações, métodos de extração e purificação de ceras.

2.1 CERAS

As ceras podem ser classificadas de acordo com sua aplicação, propriedades físico-químicas ou origem, podendo ser de ocorrência sintética ou natural, conforme apresentado na Figura 2.1.

As ceras sintéticas adquirem sua natureza cerosa durante sua síntese e, são constituídas por hidrocarbonetos de cadeia longa com a ausência de grupos funcionais (Wolfmeier et al., 2005), enquanto as ceras naturais são constituídas predominantemente por ésteres (C₃₀-C₆₀) (Mahadevan, 1978; Attard et al., 2015), ácidos carboxílicos (C₂₀-C₅₀), álcoois de cadeia longa (C₂₀-C₃₄), além de menores proporções de outros constituintes lipídicos insolúveis em água, tais como os hidrocarbonetos, alcanos de cadeia longa, alcenos, cetonas, aldeídos e esteróis (Řezanka e Sigler, 2006; Irmak et al., 2006; Gnanaraj, 2012).

As ceras de ocorrência natural são produtos oriundos do metabolismo animal ou vegetal, formadas através de processos bioquímicos e, este grupo é dividido entre ceras fósseis e não fósseis. As ceras fósseis foram formadas devido a sedimentação em períodos geológicos anteriores e, englobam as ceras de lignite, montan e turfa, que consistem em compostos oxigenados, além das ceras de petróleo como é o caso da ozocerite e parafina, que são compostas predominantemente por hidrocarbonetos não polares (Wolfmeier et al., 2005; Parish e Grainger, 2017).

Figura 2.1 - Classificação das ceras de acordo com sua origem

Fonte: Adaptado de Cottom (1994), Wolfmeier et al. (2005) e NPCCS (2013).

Como exemplo de ceras de origem animal tem-se as ceras de abelha, lã de ovelha (lanolina); e de origem vegetal tem-se destaque as ceras extraídas a partir dos arbustos de candelila, palmeira de carnaúba, cana-de-açúcar, fibra de algodão, óleo do farelo de arroz, dentre outros. Estas ceras também podem ser extraídas a partir de resíduos vegetais, o que é interessante já que desta forma não ocorre uma competição com a indústria agrícola e com a produção de alimentos, representando um grande potencial de crescimento no mercado (NPCCS, 2013).

No caso das ceras vegetais, a superfície das plantas ou folhas é revestida por uma mistura esbranquiçada de lipídios que dão origem a uma camada fina de cera, cobrindo toda a superfície externa da planta e/ou folha, formando uma interface com a atmosfera (Nazato et al., 2012; Asikin et al., 2012). A interface formada pela existência desta cera epicuticular possui característica de super hidrofobicidade e propriedade auto-limpante (efeito lótus), à medida em que age como uma barreira protetora, limitando a difusão de água e solutos, o que propicia uma maior resistência à seca e a outros estresses ambientais, além de proporcionar proteção contra a luz ultravioleta, doenças e ataque de insetos (Řezanka e Sigler, 2006; Inarkar e Lele, 2012).

As ceras naturais raramente são utilizadas industrialmente na sua forma original, sendo modificadas por refinação, destilação, extração, hidrogenação, branqueamento ou oxidação (Parish e Grainger, 2017).

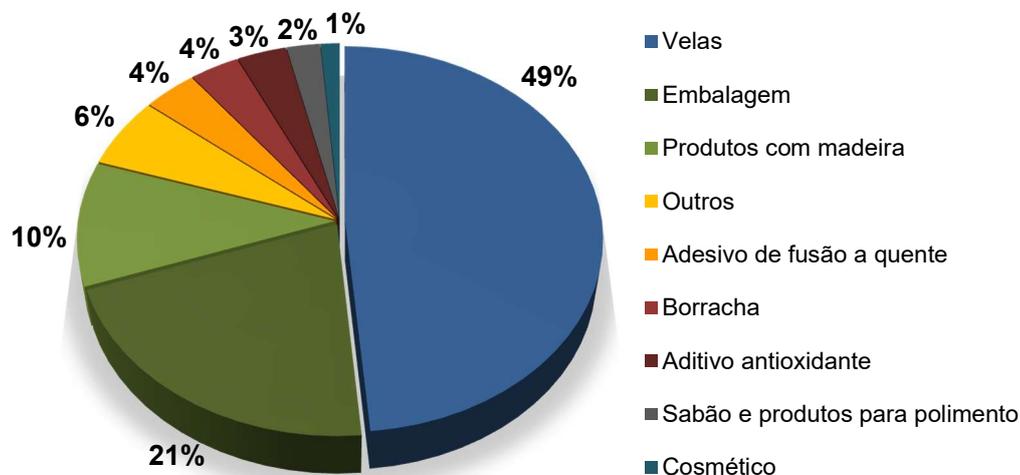
Frequentemente as ceras são caracterizadas quanto as suas propriedades físicas, químicas e térmicas, para permitir a sua identificação, diferenciação e classificação. Como a cera se refere a um material que é sólido a temperatura ambiente e, ao ser submetida a temperaturas ligeiramente mais altas, torna-se um líquido de baixa viscosidade (Phukan, 2016); a determinação da maioria de suas características normalmente é realizada a partir de adaptações das metodologias empregadas na caracterização de óleos e gorduras (Hamilton, 1995; Lopes, 2010).

As ceras normalmente são caracterizadas fisicamente quanto à cor, odor, ponto de fusão, amolecimento e penetração e, quimicamente quanto ao seu índice de acidez, iodo, saponificação e matéria insaponificável (Parish e Grainger, 2017). Além das propriedades físico-químicas, as características térmicas são parâmetros importantes a serem consideradas para a caracterização e funcionalidade de certas aplicações de ceras, como é o caso das temperaturas de solidificação e fusão, que podem ser avaliadas através da análise por calorimetria exploratória diferencial (Cebula e Smith, 1991; Gandra, 2006).

Os dados referentes à solubilidade da cera ainda são escassos, e o conhecimento de sua solubilidade é essencial para promover sua aplicação em diferentes segmentos industriais, como em cosméticos, produtos têxteis, papeis, revestimento de frutas e vegetais, lubrificantes, adesivos, polimentos, produtos farmacêuticos, entre outros (Inarkar and Lele, 2012).

Em 2016 o valor do mercado global de cera foi superior a US \$ 8,06 bilhões (Pulidindi, 2016). Estima-se que até 2022, a demanda global por cera cresça 1,3%, enquanto a oferta de ceras naturais e sintéticas cresça 0,8% ao ano (Pimenta e Sharma, 2017), evidenciando que existe mercado para a ampliação da produção de ceras. De acordo com Wei (2012), a demanda global de cera em 2012 foi de 3025 kt, sendo esta utilizada para diferentes aplicações, conforme apresentado na Figura 2.2.

A indústria de velas apresenta grande expressividade no emprego de ceras, porém a utilização de ceras para este fim tem diminuído drasticamente (Wei, 2012; NPCS, 2013; Pimenta e Sharma, 2017), abrindo espaço para a sua empregabilidade nas mais distintas áreas e em aplicações de maior valor agregado (como fármacos), conforme exemplificado na Tabela 2.1.

Figura 2.2 - Estimativa da demanda global de ceras de acordo com sua aplicação

Fonte: Adaptado de Wei (2012)

Tabela 2.1 - Aplicação de cera vegetal purificada

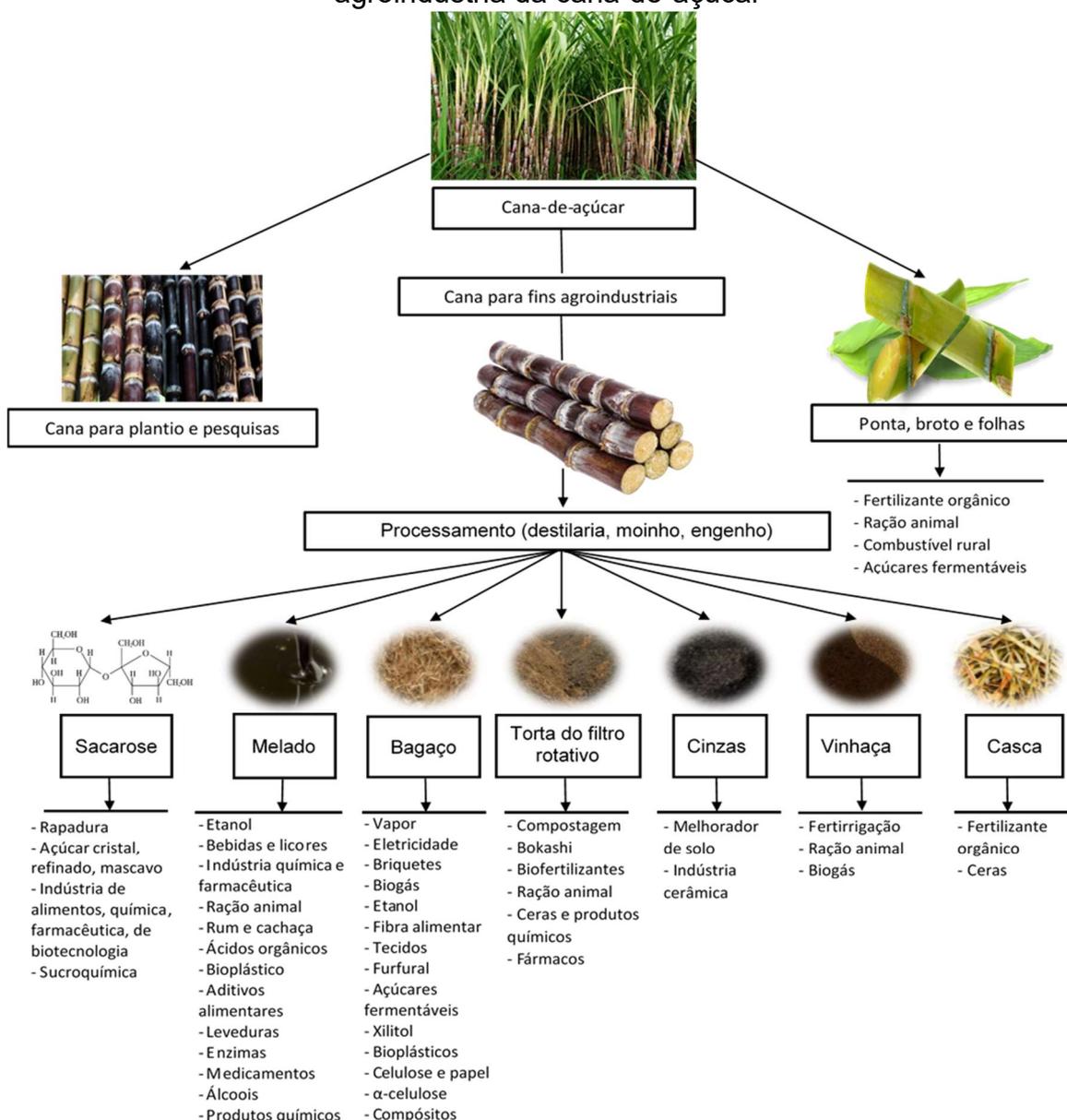
Aplicação	Princípio/Característica	Exemplo
Materiais de construção	Repelente de água e resistência ao inchaço causado pela umidade	Aglomerados de madeira
Indústria eletrônica	Material dúctil, isolante e adesivo	Revestimento de cabos, na aglutinação de materiais e na fabricação de capacitores.
Velas	Material de consistência, ponto de fusão e aparência característico	Iluminação, decoração e uso terapêutico
Adesivos	Flexibilidade e alongamento.	Adesivo de fusão a quente
Cosméticos	Propriedades hipoalérgicas, emolientes, brilho e consistência	Batom, rímel, delineador, sombra, base, desodorante, hidratante e protetor solar
Fármacos	Confere brilho e consistência ou atua como agente ativo	Comprimidos e pomadas
Tintas	Brilho, capacidade deslizante e resistência à abrasão	Tintas gráficas de impressão
Revestimento	Proteção contra umidade, aumento da rigidez e flexibilidade	Cosméticos, alimentos, embalagens, couro, produtos de madeira, fármacos
Polimento	Retarda a penetração de ar e umidade, e evita risco e abrasão	Pisos de madeira e móveis, calçados, automóveis
Polímeros	Proteção contra o ressecamento e desgaste	Pneu e borracha
Alimentos	Melhora a aparência, retarda a desidratação e oxidação	Queijo, carne, vegetais e frutas
Material escolar	Maleabilidade, flexibilidade, aderência ao papel e não toxicidade	Giz de cera e lápis de cor
Refratários	Baixa viscosidade e alta plasticidade	Tijolos refratários
Têxtil	Efeito lubrificante e redutor de atrito	Nylon e misturas de fibras sintéticas com fibras naturais (seda, algodão e lã)

Fonte: Adaptado de Inarkar e Lele (2012), Nuissier et al. (2002); Phukan, (2002); NPCCS (2013), Pimenta e Sharma (2017) e Multiceras (2018).

2.2 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das culturas agrícolas mais importantes para o Brasil, sendo este o maior produtor mundial da cana-de-açúcar, com estimativa de produção de 628,1 milhões de toneladas na safra de 2021/2022 (CONAB, 2021). A utilização da cana-de-açúcar se estende a diversos segmentos, uma vez que esta é uma cultura versátil e rica fonte de alimentos, fibras, forragem, fertilizante, além de combustíveis e produtos químicos (Solomon, 2011). Alguns dos produtos, coprodutos, subprodutos e potenciais derivados da agroindústria da cana-de-açúcar estão apresentados na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Produtos, coprodutos, subprodutos e potenciais derivados da agroindústria da cana-de-açúcar



Fonte: Adaptado de Aguilar-Rivera (2017)

De acordo com Martuchi (1983) e Rozário (2006), a cana-de-açúcar é composta majoritariamente por água (65 - 75%), seguida de fibras, açúcares e outros componentes, como os lipídios totais (incluindo as ceras), conforme composição média apresentada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição química da cana-de-açúcar

Compostos	Teor (%)
Água	65,00 - 75,00
Fibras	4,00 - 14,00
Açúcares	12,00 - 18,00
Cinzas	0,40 - 0,80
Matéria nitrogenada	0,30 - 0,60
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: Martuchi (1983) e Rozário (2006).

A colheita e o processamento da cana-de-açúcar estão associados à geração de grandes volumes de subprodutos, como as folhas, cascas, bagaço, torta do filtro rotativo e melaço. Estima-se que a partir de 100 toneladas de cana-de-açúcar, podem ser produzidos 14,3t de açúcar bruto, 27,2t de bagaço, 5,2t de torta de filtro rotativo, 2,6t de melaço e 50,7t de água residual (Luo et al., 2018).

Alguns destes subprodutos podem ainda ser processados a fim de obter produtos de maior valor agregado para aplicações químicas, petroquímicas e microbianas (Inarkar e Lele, 2012; Attard et al., 2015), promovendo com isso, a valorização destes subprodutos. Um exemplo deste aproveitamento é a utilização da torta do filtro rotativo e da casca da cana-de-açúcar para a extração da cera.

A torta do filtro rotativo é o subproduto obtido da produção de açúcar e álcool e, é eliminada durante o processo de decantação do sumo de cana, sendo normalmente subaproveitada como fertilizante naturais em campos de cultivo (Attard et al., 2015; Feng et al., 2015). Cada tonelada de cana moída gera em torno de 30-40 kg de torta do filtro rotativo, que contém aproximadamente 7% de cera bruta (Solomon, 2011; Feng et al., 2015).

Embora seja gerada em menor volume, a casca da cana-de-açúcar apresenta-se também como uma boa alternativa para a obtenção da cera. A casca corresponde à porção mais fina, escura, dura e abundante em cera, compondo cerca de 20% da

massa da cana (Feng et al., 2015). Este subproduto é obtido da raspagem da cana destinada à moagem para obtenção da garapa e, normalmente, é utilizado como fertilizante natural nos campos de cultivo. Uma exemplificação do equipamento utilizado para fazer a raspagem da casca da cana-de-açúcar está apresentado na Figura 2.4.

Figura 2.4 - Raspador e limpador de cana-de-açúcar



Como a casca e outros subprodutos obtidos a partir da cana-de-açúcar apresentam-se como ricas fontes de nutrientes, as propriedades físicas, químicas e biológicas destes materiais orgânicos afetam significativamente o solo quando estes são utilizados como fertilizantes (Bhosale et al., 2012). A presença de cera nestes materiais pode acarretar na deterioração das propriedades físicas, permeabilidade, aeração, estrutura e composição do solo, além de dificultar a absorção de elementos nutrientes pelas plantas, à medida em que a decomposição do material orgânico ocorreria de forma mais rápida (Bhosale et al., 2012). Logo a remoção da cera pode melhorar a qualidade do material utilizado como adubo orgânico e permitir a sua utilização na obtenção de produtos de maior valor agregado.

Como a quantidade de cana destinada para a obtenção de garapa, e consequente geração de casca como subproduto, é bem menor do que a cana destinada para a indústria sucroalcooleira, em um primeiro momento imagina-se que a obtenção de cera a partir da casca não seja um processo viável por causa da dificuldade de se obter este produto em larga escala. Porém, o maior fornecedor de cana para a produção de garapa no estado de São Paulo (o município de Cajuru), produz diariamente 20 toneladas de cana (Quartier, 2014). Como a cana possui entre 0,1 a 0,3% de cera (García et al., 1986 e 2003) e, considerando que toda a produção

de cana da cidade de Cajuru fosse utilizada para a obtenção de cera, seria possível produzir diariamente, no mínimo, 200 kg de cera bruta, evidenciando o potencial de produção de cera a partir da casca da cana-de-açúcar.

Logo, o Brasil sendo um grande produtor de cana-de-açúcar, apresenta-se também como um potencial fornecedor de cera e outros subprodutos lipídicos, podendo adicionar benefícios econômicos para o país e melhorar a utilização dos recursos vegetais.

2.2.1 Cera da cana-de-açúcar

Como ocorre com a maioria dos vegetais, a cera da cana-de-açúcar é encontrada aderida à superfície da casca (Figura 2.5), principalmente perto dos nós e das bainhas foliares, e age como uma barreira protetora, minimizando a evaporação de água e protegendo contra doenças e ataque de insetos (Balch, 1953; Frutuoso, 1989; Inarkar e Lele, 2012). Normalmente este material apresenta-se com coloração variando entre esbranquiçado a amarelo escuro (Tamaki et al., 2003).

Figura 2.5 - Cera aderida à casca da cana-de-açúcar



Fonte: Ferreira (2017)

De acordo com García et al. (1986 e 2000), a partir da cera bruta podem ser extraídas três frações de componentes, que correspondem aos óleos (35 - 40%), resinas (15 - 17%) e a cera refinada (38 - 45%). O óleo corresponde ao líquido de cor verde escura, de composição similar a outros óleos vegetais, solúvel em acetona a 25 °C e, que pode ser utilizado na alimentação de animais, obtenção de fitoesteróis, plastificante em pneus e antiespumantes. A resina é um sólido de cor negra brilhosa e insolúvel em acetona e isopropanol a temperaturas de 70 a 100 °C (García et al.,

2000; Phukan, 2002), sendo empregada principalmente como aditivo plastificante em pneus e em misturas com cera para a fabricação de tintas para papel carbono e fitas de máquina (Paixão, 2008). A cera refinada (fração dura), obtida após separação da fração oleosa e resina, é a fração solúvel em acetona a 100 °C e isopropanol a 80 °C.

As ceras da cana-de-açúcar podem ser constituídas por diferentes classes de compostos, como alcanos de cadeia longa, ésteres de cera, álcoois e ácidos graxos livres, cetonas, aldeídos, triglicerídeos e esteróides (Purcell et al., 2005; Asikin et al., 2012). A composição da cera da cana-de-açúcar pode variar muito principalmente de acordo com a variedade da cana, mas também pelas condições climáticas e agrônômicas nas quais a cultura é cultivada, tais como a localização da plantação, tipo solo, hábito de queimar os canaviais, método de colheita (manual ou mecanizado), tipo de moagem, grau de maturação, dentre outros (Balch, 1953; Frutuoso, 1989; Georges et al., 2006; George et al., 2010).

As composições de algumas ceras brutas relatadas na literatura estão apresentadas na Tabela 2.3, sendo observada a presença de aldeídos, ésteres, álcoois e ácidos graxos, triglicerídeos, esteróis, alcanos, cetonas e lipídios polares. Os lipídios totais que compõem a cera podem ser classificados como polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios e esfingolipídios) e neutros ou apolares (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e esteróis) (Manirakiza et al., 2001; Valix, 2004).

Tabela 2.3 - Composição da cera bruta da cana-de-açúcar

Composto	Referência		
	Asikin et al. (2012)	Inarkar e Lele (2012)	Valix (2004)
Teor (%)			
Aldeídos, ésteres e lipídios polares	57,5 - 62,3	66,3	73,2 - 76,1
Aldeídos e cetonas	-	0,1	1,6 - 3,2
Álcoois graxos	22,6 - 28,0	0,2	7,9 - 8,3
Ácidos graxos	3,8 - 4,7	4,6	-
Ácidos graxos livres e esteróis	2,5 - 2,6	-	5,9 - 7,8
Triglicerídeos	5,9 - 8,4	-	0,0 - 1,6
Alcanos	-	28,8	-

2.2.1.1 Extração

O primeiro relato de tentativa de isolamento da cera da cana-de-açúcar foi feito por Avequin em 1841, mas somente em 1916 a cera de cana-de-açúcar começou a ser produzida industrialmente (Paturau, 1989). Embora o Brasil seja o maior produtor de cana-de-açúcar, ainda não existem produtores e fornecedores desta promissora

cera de forma abrangente (Graille et al., 2003), ao contrário de Cuba, onde há um esforço para o desenvolvimento de tecnologias e mecanismos que permitam a produção industrial da cera da cana-de-açúcar, o que resultou em grandes números de depósitos de patentes (Vieira, 2003; Nazato et al., 2012).

As ceras podem ser extraídas juntamente com os lipídios totais (polar e apolar) da amostra a partir do uso de diferentes solventes como clorofórmio e metanol (Asikin et al., 2008), tolueno e benzeno (Bhosale et al., 2012), tetracloreto de carbono (Inarkar e Lele, 2012), hexano (Attard et al., 2015), ciclo-hexano e isopropanol (Vieira, 2003), éter de petróleo (Qi et al., 2017), além de solventes alternativos como etanol (Buttar et al., 1999), limoneno e terebentina (Oliveira, 2018). O teor de cera presente na amostra depende de fatores como o tipo de matéria-prima, tipo de solvente, razão solvente/soluto, tempo e temperatura empregada na extração, além do tamanho da partícula e umidade (Villar et al., 2005; Rabelo et al. 2015). Esta dependência pode ser observada na Tabela 2.4, onde estão apresentados os rendimentos brutos obtidos a partir da utilização de diferentes matérias-primas e solventes, utilizando o extrator Soxhlet.

Embora Inarkar e Lele (2012) tenham realizado a extração da cera da casca da cana-de-açúcar por longos períodos (8 - 10 h) os mesmos obtiveram baixos rendimentos de cera. O mesmo foi observado com Phukan e Boruah (1999) sob as mesmas condições de operação de Inarkar e Lele (2012), provavelmente em decorrência da matéria-prima escolhida conter baixos teores de lipídios.

O maior rendimento de cera da torta do filtro rotativo observado por alguns autores pode estar associado ao fato de que uma grande porção do caldo de cana é filtrado, resultando em uma maior concentração de cera na torta do filtro rotativo, o que pode influenciar o rendimento total de cera. Embora a cera se concentre na casca da cana-de-açúcar, grande parte dos estudos apresentados na Tabela 2.4 alcançaram baixos rendimentos. A dependência das condições de cultivo e processamento da cana-de-açúcar pode ter acarretado na obtenção de uma matriz de cana com baixo teor de cera bruta.

Viera (2003) utilizou diferentes solventes (hexano, ciclo-hexano, isopropanol e etanol) na extração da cera oriunda da torta do filtro rotativo. Foram observados rendimentos superiores quando utilizado isopropanol e etanol como solventes, porém após determinação do teor de cera purificada, foram observadas menores quantidades de cera nos extratos obtidos a partir de isopropanol e etanol, o que é um

indicativo da presença de materiais não lipídicos solúveis em álcool nos extratos. Como a cera extraída com ciclo-hexano apresentou coloração verde muito forte, o autor optou por conduzir os demais ensaios com a cera extraída com hexano e que apresentou rendimento de 7,1%.

Tabela 2.4 - Rendimentos de cera bruta da cana-de-açúcar a partir de diferentes matérias-primas e solventes

Matéria-prima	Solvente	Rendimento bruto (%)*	Referência
Torta do filtro rotativo	Tolueno	14,6	Azzam (1984)
	Naftaleno	14,0	
	Gasolina	13,0	
	Álcool refinado	12,7	
Torta do filtro rotativo	Tetracloroeto de carbono	3,5 - 4,1	Phukan e Boruah (1999)
Resíduo de fermentação e destilação	Ciclo-hexano	7,0	Nuissier et al. (2002)
	Éter de petróleo	3,7	
Casca	Tolueno	4,2	García et al (2003)
	Tricloroetileno	4,7	
	Hexano	7,1	
	Ciclo-hexano	7,5	
Torta do filtro rotativo	Isopropanol	12,3	Vieira (2003)
	Etanol	12,1	
	Heptano	4,0 - 7,3	
Torta do filtro rotativo	Hexano	7,0	Gandra (2006)
Casca	Hexano e metanol (20:1, v/v)	1,0	Asikin et al. (2012)
Torta do filtro rotativo	Tolueno e Benzeno	5,4 - 5,6	Bhosale et al. (2012)
		6,9 - 7,4	
Casca	Tetracloroeto de carbono	1,0	Inarkar e Lele (2012)
Torta do filtro rotativo	Etanol	5,4	Ou et al. (2012)
Casca	Etanol	**	Feng et al. (2015)
Casca	Hexano	7,2 - 8,3	Oliveira (2018)

Nota: *Rendimento: (massa cera bruta/massa matéria-prima)x100

**Dados não apresentados

Buttar et al. (1999) também observou que o aumento de polaridade do solvente empregado na extração pode contribuir para um maior rendimento de cera bruta. Os autores obtiveram rendimento próximo de 7% quando utilizando solventes apolares como o hexano, clorofórmio ou tolueno e, de cerca de 20% quando utilizando etanol.

Oliveira (2018) avaliou a cera extraída da casca da cana-de-açúcar a partir da utilização de três solventes: hexano, limoneno e terebentina. Os rendimentos de cera

bruta extraída com hexano foram comparáveis aos encontrados na literatura. Entretanto, a partir da utilização de solventes terpênicos (limoneno e terebentina) foram observados rendimentos bem superiores ao teor total de lipídios (7,8%), evidenciando que outros processos poderiam estar acontecendo além do fenômeno de extração, hipótese esta que foi confirmada pelo referido autor.

Após a extração da cera bruta de cana-de-açúcar, é necessário que este material seja submetido ao processo de refino ou purificação. Esta etapa tem por objetivo promover a eliminação da cor escura, açúcares, resinas e algumas impurezas que podem conferir propriedades indesejadas à cera bruta, como caráter viscoso, baixo ponto de fusão e consistência pegajosa (Balch, 1953; Azzam, 1986; Frutuoso, 1989; García et al., 1999).

2.2.1.2 Purificação

A cera presente em óleos, quando os mesmos são resfriados ou armazenados por longos períodos, pode conferir um aspecto turvo em decorrência de sua cristalização. Para a obtenção de uma cera de coloração clara e livre de resinas, geralmente é realizada a etapa de *winterização*, que consiste no resfriamento do óleo para a formação dos cristais, e posterior separação dos mesmos por centrifugação (Kolodziejczyk, 2000). A cristalização fracionada com solvente é um processo termomecânico de separação capaz de promover um crescimento mais rápido dos cristais, uma vez que possibilita uma redução na viscosidade do sistema, o que leva a uma maior mobilidade das moléculas e a uma aceleração da cristalização (Shahidi, 2005; Deffense, 1985).

A utilização de solventes apolares, como o hexano, requer mais energia para possibilitar o resfriamento da amostra. Mas além do aspecto econômico, a escolha de um solvente deve envolver uma série de considerações acerca do tipo de produto fracionado desejado, segurança, estabilidade e perdas de voláteis (Thomas, 1985). Neste sentido, o hexano apresenta-se como um excelente solvente a ser utilizado na purificação de ceras.

A alta temperatura de fusão destas ceras resulta na formação de sedimentos que podem ser facilmente separados por cristalização a partir de solventes seletivos (que apresentem excelente solubilidade nos lipídios, mas baixa solubilidade nas ceras) a baixas temperaturas, como a acetona (Balch, 1953; Gunawan et al., 2006). O uso da acetona promove a rápida solubilização dos lipídios solúveis e a porção de

cera dura insolúvel pode ser separada por filtração ou centrifugação (Paturau, 1989). Seguindo esta premissa, grande parte dos processos de purificação de ceras publicados na literatura se baseia na purificação a partir do uso de acetona.

Gracien e Arévalo (1981), realizaram a dissolução do óleo de girassol em acetona e resfriaram a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 16 h a cera precipitada foi separada por filtração, lavada, seca e pesada. Isbell et al. (1996) e Soomro e Sherazi (2013) realizaram a purificação da cera oriunda de óleos vegetais dissolvendo-as em acetona:hexano (5:1, 6 mL), seguida das etapas de aquecimento, resfriamento e centrifugação. Na sequência o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em acetona para a formação dos cristais. Sucessivas recristalizações com acetona garantiram a remoção completa de qualquer triglicerídeo residual após filtração dos cristais.

Os parâmetros de controle mais importantes nos processos de purificação são a temperatura de cristalização, velocidade de resfriamento do sistema e de agitação. Levando estes aspectos em consideração, Vieira (2003) propôs uma metodologia muito similar à adotada por Isbell et al. (1996) e Soomro e Sherazi (2013), que consistiu na purificação por cristalização fracionada com hexano e acetona. Vieira (2003) realizou um planejamento experimental e análise de superfícies de resposta para avaliar os parâmetros de purificação capazes de permitir as melhores condições de cristalização, a fim de se obter uma fração com boas propriedades de filtração. A melhor condição encontrada pelo referido autor também foi utilizada por Oliveira (2018), e envolveu as etapas de homogeneização à quente da cera bruta com hexano (1:20, m/v), resfriamento ($10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h), centrifugação, lavagem do precipitado com acetona e filtração.

Além das condições de cultivo e extração anteriormente evidenciadas, a composição da cera purificada pode variar muito de acordo também com o método de purificação empregado, conforme apresentado na Tabela 2.5.

Embora as composições das ceras obtidas por McCloud (1950), citado por (Balch, 1953); Frutuoso (1989), Valix (2004) e Phukan e Boruah (1999) sejam distintas, os componentes encontrados em maiores concentrações são os ésteres, ácidos graxos e álcoois graxos (policosanol).

Tabela 2.5 - Composição da cera purificada da cana-de-açúcar

Composto	Referência			
	McLoud (1950)	Frutuoso (1989)	Valix (2004)	Phukan e Boruah (1999)
Teor (%)				
Éster	66,0	55,0	6,2 - 11,0	80,0 - 85,0
Ácidos graxos	27,0	8,0	-	3,0 - 6,0
Álcoois graxos	5,0	10,0	1,8 - 44,5	1,0 - 1,5
Hidrocarbonetos	2,0	2,0	-	1,0 - 1,5
Aldeídos e cetonas	-	25,0	2,5 - 9,5	-
Triglicerídeos	-	-	2,5 - 9,5	-
Ácidos graxos livres, esteróis e lipídios polares	-	-	36,8 - 87,2	-

2.3 POLICOSANOL

O policosanol é uma mistura formada por álcoois alifáticos de C₂₀-C₃₄ carbonos, composta por tetracosanol (C₂₄) (0,001 - 2,0%), hexacosanol (C₂₆) (3,0 - 10,0%), heptacosanol (C₂₇) (0,1 - 3,0%), octacosanol (C₂₈) (60,0 - 70,0%), nonacosanol (C₂₉) (1,0 - 2,0%), triacontanol (C₃₀) (10,0 - 15,0%), dotriacontanol (C₃₂) (5,0 - 10,0%), tetratriacontanol (C₃₄) (0,1 - 5,0%), além de outros álcoois graxos em menores quantidades (Irmak et al., 2006; Singh et al., 2006; Marinangeli et al., 2010; Feng et al., 2015; Weerawatanakorn et al., 2017).

Esta mistura de álcoois alifáticos pode ser naturalmente encontrada, na forma livre ou esterificada, na fração insaponificável de lipídios encontrados em fontes vegetais como frutas, folhas, superfícies de plantas e sementes (Tulloch e Hoffman, 1973; Taylor et al., 2003; Irmak et al., 2006; Ramos-Zambrano et al., 2019).

2.3.1 Fontes de policosanol

O policosanol foi originalmente isolado a partir de cera de cana-de-açúcar, mas também pode ser encontrado em uma diversidade de outras fontes naturais como a cera do farelo de arroz (Ishaka et al., 2014), cera residual da cochonilha (*Dactylopius coccus*) (Ramos-Zambrano et al., 2019), cera de abelha (Srisaipet et al., 2016 e 2017), cera do inseto chinês (*Ericerus pela*) (Ma et al., 2018); óleo de trigo (Asikin et al., 2012), semente de perilla (Adhikari et al., 2006; Jung et al., 2011), semente de uva (Jung et al., 2011), azeitona (López-López et al., 2008), milho (Harrabi et al., 2009), amendoim (Cherif et al., 2010), girassol, canola, açafrão, soja, gergelim (Jung et al., 2011), tomate (Giuffrè e Capocasale, 2015), semente de cardo mariano (*Silybium marianum* L.) (Harrabi et al., 2018), dentre outros, conforme Tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Diferentes fontes naturais de policosanol e octacosanol

Amostra	Quantidade de Policosanol (mg.100g⁻¹)	Teor de octacosanol (%)	Referência
Amendoim	4,9 - 54,2	0,3 - 2,9	Cherif et al. (2010)
Semente de perilla	18,4 - 65,5	25,5 - 68,4	Adhikari et al. (2006) e Jung et al. (2011 e 2012)
Cana-de-açúcar	1,7 - 220,8	17,9 - 86,2	Irmak et al. (2006), Asikin et al. (2012), Attard et al. (2015) e Del Río et al. (2015)
Semente de uva	24,5	22,0	Jung et al. (2011)
Farelo de arroz	17,1	19,8	Jung et al. (2011)
Gérmen de trigo	16,4	85,4	Irmak et al. (2006)
Grãos de milho	0,3 - 16,6	6,9 - 10,0	Harrabi et al. (2009) e Jung et al. (2011)
Azeitonas	3,2 - 29,2	12,5 - 56,1	López-López et al. (2008), Jung et al. (2011) e Lukic et al. (2015)
Folhas de chá-verde	7,3 - 136,4	25,9 - 43,2	Choi et al. (2016)
Girassol	3,8	19,6	Jung et al. (2011)
Canola	2,3	20,3	Jung et al. (2011)
Açafrão	2,0	25,0	Jung et al. (2011)
Soja	0,7	9,5	Jung et al. (2011)
Gergelim	0,6	31,7	Jung et al. (2011)
Semente do tomate	6,5 - 7,2	39,2 - 41,9	Giuffrè e Capocasale (2015)

Apesar de ser a fonte com maior teor de policosanol, a cana-de-açúcar também é produzida em quantidades muito maiores do que as demais culturas apresentadas (Tabela 2.6), o que viabiliza ainda mais o seu emprego. A quantidade de policosanol, e consequentemente de octacosanol, encontrado em vegetais varia de acordo com fatores como espécie e grau de maturação dos frutos (Harrabi et al., 2009 e 2018).

Além das variáveis anteriormente mencionadas, a parte específica da planta a ser analisada também interfere significativamente na composição da cera, e consequentemente de policosanol. Conforme observado na Tabela 2.7, a cera é mais abundante na casca, sendo observadas concentrações de octacosanol próximo a 80%, dentre os álcoois graxos existentes.

Por ser o constituinte majoritário do policosanol, acredita-se que o octacosanol seja o principal responsável pela eficácia do uso do policosanol como medicamento (Castaño et al., 2000; Marinangeli et al., 2010).

Tabela 2.7 - Teor de octacosanol dentre os álcoois graxos existentes na cana-de-açúcar

Matéria-prima	Teor de octacosanol (%)	Referência
Casca	81,1	Irmak et al. (2006)
Folhas	46,4	
Torta do filtro rotativo	64,6	Wada (2008)
Torta do filtro rotativo	58,5	Lopes (2010)
Casca	81,1 - 87,8	Asikin et al. (2012)
Casca	86,2	Attard et al. (2015)
Folhas	17,9	
Bagaço	78,5	Feng et al. (2015)
Casca	45,2	
Bagaço	58,8	Del Río et al. (2015)
Palha	56,5	
Casca	17,8 - 31,3	Oliveira (2018)

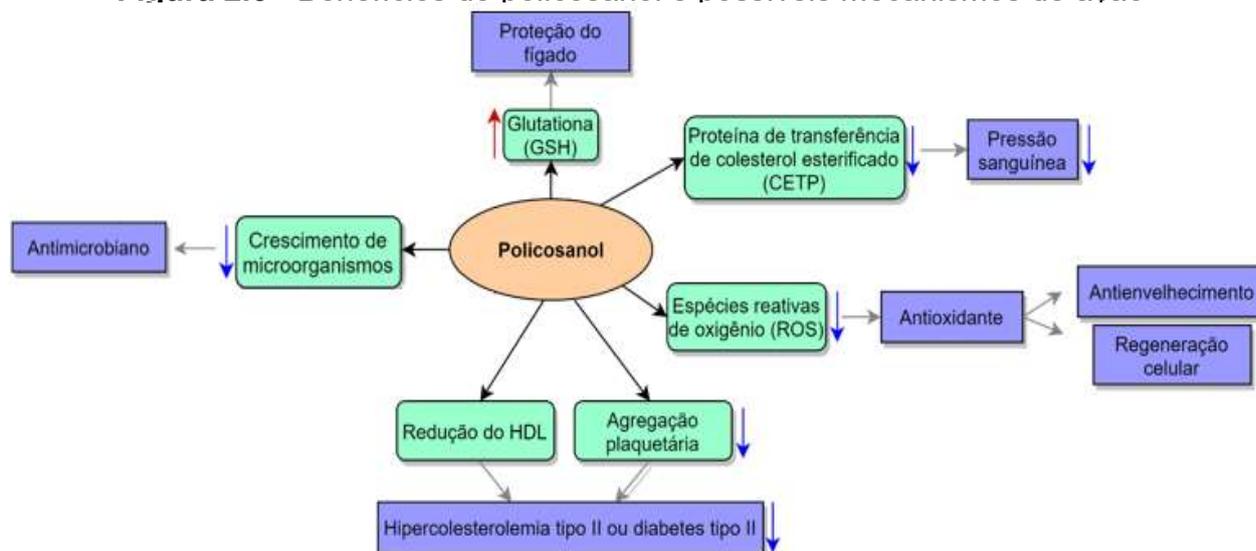
2.3.2 Efeitos do policosanol na promoção da saúde

Diversos artigos e ensaios clínicos demonstraram que o uso do policosanol contendo de 50 a 60% de octacosanol, apresenta efeitos benéficos na promoção da saúde, como o alívio do estresse e restauração do sono (Kaushik et al., 2017); prevenção da obesidade induzida por dieta hiperlipídica e distúrbios metabólicos (Sharma et al., 2019); redução da agregação plaquetária (Arruzazabala et al., 1993; Marinangeli et al., 2010); efeitos protetores sobre Parkinson (Wang et al., 2010); inibição da osteoporose (Tamaki et al., 2003); aumento da resistência física (Consolazio et al., 1964); redução de lesões hepáticas (Ohta et al., 2008); ação anti-inflamatória (Fernandez-Arche et al., 2009; Guo et al., 2017a), anti-úlceras (Carbajal et al., 1995), antiviral (Pope et al., 1998), antioxidante e antibacteriana (Sengupta et al., 2018); antilipemiante (Leal, 2010), além do efeito que desperta mais interesse dos pesquisadores que é o relacionado com a diminuição dos níveis de colesterol no sangue (Arruzazabala et al., 1993; Singh et al., 2006; Marinangeli et al., 2010). Um esquema resumido de alguns benefícios do uso do policosanol e mecanismos de ação está apresentado na Figura 2.6.

O policosanol atua inibindo as etapas iniciais da biossíntese do colesterol endógeno e aumentando o catabolismo da lipoproteína de baixa densidade (Castaño et al., 2000; He et al., 2016). Como apenas quantidades muito pequenas são ingeridas na dieta, para se obter benefícios para a saúde, o policosanol deve ser ingerido como suplemento (Taylor et al., 2003). Em estudos realizados com humanos, a ingestão

diária de 5 a 20 mg de policosanol foi capaz de melhorar os perfis lipídicos, diminuindo os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) ou “colesterol ruim” entre 21 a 29% e, aumentando o colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL) ou “colesterol bom” entre 8 a 15% (Arruzazabala, et al., 1993; Carbajal et al., 1995; Gouni-Berthold e Berthold, 2002; Kim et al., 2017; Cho et al., 2019; Shen et al., 2019).

Figura 2.6 - Benefícios do policosanol e possíveis mecanismos de ação



Fonte: Adaptado de Shen et al. (2019)

Já foram realizados diversos estudos clínicos comparando o efeito do uso do policosanol com fármacos comerciais como a sinvastatina, pravastatina, lovastatina e bezafibrato, que são utilizados no tratamento de dislipidemias (aumento de lipídios no sangue, principalmente colesterol e triglicerídeos). Foi verificada uma redução nos níveis de LDL de 17,9 e 19,8% quando utilizado sinvastatina e policosanol, respectivamente (Marinangeli et al., 2010) e, de 27,7 e 32,4% quando analisado o efeito provocado pela utilização de lovastatina e policosanol, respectivamente (Castaño et al., 2000).

O mesmo comportamento de redução dos níveis de LDL foi observado em outros estudos com a ingestão diária de 10 mg de policosanol em relação à ingestão de estatinas em doses semelhantes (Viola et al., 2008). Quanto à toxicidade, o policosanol é bem tolerado e seguro tanto em seres humanos como em animais (Irmak et al., 2006; Taylor et al., 2003).

O custo do policosanol é uma das limitações de seu uso, uma vez que 1 kg desses álcoois graxos na sua forma pura (>99%) pode atingir de US\$ 55.000 a 65.000

no mercado (Sánchez et al., 2015; Nu-check Prep., 2020). O modo mais comum de encontrar o policosanol comercialmente é na forma de comprimidos contendo de 10 a 20 mg de composto ativo. No Brasil o policosanol pode ser facilmente encontrado em farmácias na forma de suplemento, com valor aproximado de R\$ 27,00 para frascos de 60 unidades de comprimidos contendo 10 mg de policosanol (Oficial Farma, 2021). Na Figura 2.7 são apresentados alguns exemplos de como o policosanol é comercializado mundialmente.

Figura 2.7 - Policosanol comercial



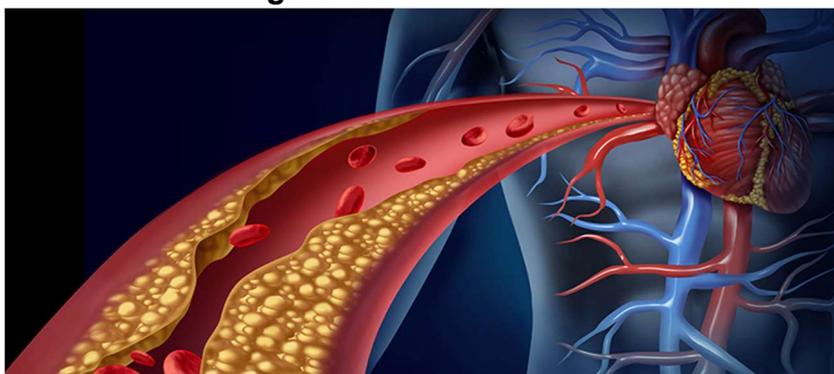
2.3.2.1 Doenças ateroscleróticas

De acordo com a Associação Mundial da Saúde (WHO, 2020), nos últimos 15 anos as doenças isquêmicas como o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e o Acidente Vascular Cerebral (AVC) foram as principais causas de morte em todo o mundo, contabilizando um total de 8,9 milhões de mortes só no ano de 2019. Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2021), as doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte no Brasil, sendo mais de 1100 mortes por dia, cerca de 46 por hora, e 1 morte a cada 1,5 minutos (90 segundos). Até o início de agosto de 2021 já haviam sido registrados mais de 240 mil óbitos de brasileiros por doenças cardiovasculares e, a estimativa é que este número alcance quase 400 mil óbitos até o final de 2021 (SBC, 2021).

O infarto agudo do miocárdio e o AVC são normalmente desencadeados pelo bloqueio das artérias que transportam o oxigênio através do sangue para o coração e cérebro, que é comumente causado pela doença vascular crônica aterosclerose (SBC, 2017). Aterosclerose, exemplificado na Figura 2.8, é o termo para o processo de acúmulo de gordura, colesterol e produtos residuais celulares no revestimento interno

de uma artéria, fazendo com que a mesma se estreite, enfraqueça e seja menos flexível. A este acúmulo dá-se o nome de placa, e esta faz com que a parede do vaso sanguíneo fique mais espessa, reduzindo assim a quantidade de sangue e de oxigênio que é entregue aos órgãos vitais (American Heart Association, 2017).

Figura 2.8 - Aterosclerose



Como estes eventos (infarto agudo do miocárdio e AVC) são as principais complicações da aterosclerose e conferem um risco muito elevado à saúde, faz-se necessário prevenir os fatores predisponentes da doença aterosclerótica, uma vez que muitas mortes poderiam ser evitadas ou postergadas com cuidados preventivos e medidas terapêuticas. Dentre tais fatores, tem-se destaque a hipertensão arterial, o tabagismo, sedentarismo e os níveis elevados de colesterol e triglicérides no sangue, que representam um dos aspectos mais importantes para o desenvolvimento e a progressão da doença aterosclerótica (SBC, 2017). A prevenção e o tratamento adequado dos fatores de risco das doenças cardiovasculares podem reverter esta grave situação, tendo-se destaque a potencial diminuição dos índices do colesterol no sangue ocasionados pelo uso do policosanol.

2.3.3 Propriedades físico-químicas

A estrutura genérica de álcoois graxos pode ser observada na Figura 2.9. Para ser considerado um álcool graxo, o comprimento de cadeia destes componentes pode variar de 8 a 38 carbonos e esta variabilidade de tamanho de cadeia impacta consideravelmente as propriedades físico-químicas dos mesmos (Mudge et al., 2018).

Uma das características mais influenciadas pelo tamanho da cadeia do álcool graxo é a sua solubilidade. Compostos de cadeia curta (até C₈) possuem uma considerável solubilidade em água, entretanto os mesmos não são considerados

álcoois graxos (Mudge et al., 2018). Algumas propriedades físico-químicas disponíveis para álcoois graxos de C₂₀ a C₃₀ estão resumidas na Tabela 2.8.

Figura 2.9 - Estrutura genérica dos álcoois graxos

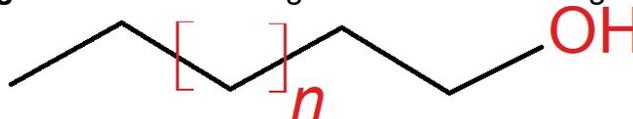


Tabela 2.8 - Propriedades físico-químicas de álcoois graxos de C₂₀ a C₃₀

Nome sistemático	Nome Trivial	Número de carbonos	Massa molecular (D)	Temperatura de Fusão (°C) ^a	Temperatura de ebulição (°C) ^b	Solubilidade em água (25 °C) (mg.L ⁻¹) ^b
Eicosanol	Arachidil	20	298,55	66,0 - 66,1	337,9	1,51E-03
Henicosanol		21	312,57	68,0 - 71,0	398,5	4,76E-04
Docosanol	Behenil	22	326,60	68,0 - 72,5	401,1	1,50E-04
Tricosanol		23	340,63	72,0 - 76,0	412,7	4,70E-05
Tetracosanol	Lignoceril	24	354,65	74,0 - 77,0	424,3	1,47E-05
Pentacosanol		25	368,68	75,0	435,9	4,60E-06
Hexacosanol	Cerotil	26	382,71	78,0 - 80,0	447,5	1,44E-06
Heptacosanol	Carboceril	27	396,73	80,0	459,1	4,49E-07
Octacosanol	Montamil	28	410,76	83,0 - 83,4	470,7	1,40E-07
Nonacosanol		29	424,79	83,5	482,3	2,35E-08
Triacontanol	Melissil	30	438,81	86,0 - 87,0	493,9	1,35E-08

Fonte: Adaptado de Mudge et al. (2018); RSC (2020).

^aExperimental

^bPredito (US Environmental Protection Agency's EPISuite™)

Dada a heterogeneidade de composição do policosanol, os dados de solubilidade desta mistura de álcoois graxos não estão disponíveis na literatura, sendo pautados apenas em termos da solubilidade de cada componente individual. Ainda assim existem dificuldades na medição destes dados em decorrência da natureza hidrofóbica-hidrofílica das diferentes partes da molécula. O grupo hidroxila fornece à extremidade da molécula um grau de solubilidade em água enquanto a cadeia alquil-carbono é hidrofóbica. Os dados de densidade e solubilidade para os componentes de maior tamanho de cadeia são menos estudados, razão pela qual não existem muitos dados disponíveis (Mudge et al., 2018).

Como o policosanol é composto majoritariamente por octacosanol, o conhecimento da solubilidade deste álcool graxo é utilizado como um indicativo da solubilidade do policosanol. Neste contexto, Cuevas et al. (2017) avaliaram a

solubilidade do octacosanol em relação ao tolueno, 1-hexanol e 1-pentanol, observando um maior valor de solubilidade para o primeiro componente. Os autores ainda destacaram que a solubilidade do octacosanol é maximizada pela utilização de altas temperaturas, uso de tolueno e de álcoois de maior tamanho de cadeia.

A partir da realização de testes de solubilidade, Ramos-Zambrano et al. (2019), escolheram utilizar o tolueno na dissolução da cera de cochonilha, já que este é um solvente classificado como amarelo (de uso problemático), comparado ao clorofórmio, comumente utilizado para dissolver o policosanol (Irmak et al., 2006; Lukic et al., 2015; Ramos-Zambrano et al., 2019) e, que é classificado como um solvente vermelho (de uso arriscado) (Byrne et al., 2016). Alguns autores realizaram a dissolução de amostras de policosanol em isooctano (Srisaipet e Aoopkham, 2015), tolueno (Asikin et al., 2012), além da dissolução de octacosanol (2 mg) em clorofórmio (1mL) e metanol (3 mL) (Nandini et al., 2012) e de octacosanol em clorofórmio (1 mg.mL⁻¹) (Cravotto et al., 2010).

Embora o clorofórmio seja um solvente de alta toxicidade, o mesmo ainda é muito empregado uma vez que se apresenta como um solvente apolar e capaz de solubilizar o policosanol a uma concentração máxima de 1,25 mg.mL⁻¹ (25 °C) e 2,5 mg.mL⁻¹ (40 °C), ilustrando a extensão da sua natureza hidrofóbica (Uribarri et al., 2002; Marinangeli et al., 2010).

2.3.4 Obtenção e análise do policosanol

Devido a sua vasta aplicabilidade, diversos estudos foram realizados acerca da obtenção, composição e caracterização do policosanol.

A extração de lipídios por solventes orgânicos, como o hexano, seguida das etapas de purificação, clivagem de ésteres e extração sólido-líquido é a forma mais empregada para a obtenção desta mistura de álcoois graxos (Ou et al., 2012; Feng et al., 2015). Neste contexto, Jung et al. (2011) realizaram a saponificação e subsequente extração do policosanol com hexano a partir de diferentes óleos vegetais. Quando analisados os óleos obtidos a partir da semente de perilla, semente de uva e farelo do arroz, foram obtidos rendimentos de 42,3, 24,5 e 17,1 mg de policosanol.100g⁻¹ de óleo e, teor de octacosanol de 55,9, 22,0 e 19,8%, respectivamente.

Srisaipet e Aoopkham (2015) avaliaram a extração e purificação de uma cera de abelha de origem tailandesa para obtenção de policosanol. A cera foi saponificada

com NaOH e, posteriormente purificada utilizando misturas de tolueno:água:etanol e isooctano:água:etanol, resultando em um policosanol composto por 40,67% de tetracosanol, 16,14% de hexacosanol 13,14% de triacontanol, 10,54% de docosanol, 9,15% de octacosanol, além de outros álcoois graxos em menores proporções.

Como a cana-de-açúcar é uma das fontes naturais mais ricas em policosanol, muitos esforços ainda estão sendo realizados para se obter esta mistura de álcoois graxos. Seguindo esta premissa, Feng et al. (2015) saponificaram a cera bruta da cana-de-açúcar com KOH, sendo a matéria insaponificável extraída com éter etílico. Ao final do processo, o policosanol obtido apresentou rendimento de 6,76% em relação à cera bruta, sendo composto por 45,17% de octacosanol.

De acordo com Laguna Granja et al. (1997 e 1999), é possível se obter policosanol a partir das etapas de saponificação da cera bruta ou purificada, com solução de hidróxido de cálcio, potássio ou sódio, seguida pela separação dos álcoois graxos por extração sólido-líquido utilizando hexano e, purificação por cristalização utilizando o mesmo solvente da extração. O procedimento adotado pelos referidos autores constituiu das etapas de saponificação e extração por solvente. O produto obtido apresentou rendimento de policosanol de 13,0 a 27,5%, com teor de álcoois variando de 92,7 a 94,3%. O octacosanol foi o componente majoritário dentre os álcoois graxos, com teor variando de 60 a 70%.

Rozário (2006) adaptou a metodologia proposta por Laguna Granja et al. (1997 e 1999), para conduzir os experimentos de forma mais prática e eficiente. A cera foi purificada pelo método de álcool a quente, seguida de saponificação com NaOH e etanol. A mistura de álcoois graxos foi separada utilizando etanol e solução salina e, o material foi purificado com acetona a fim de se obter um produto final com maior teor (92,3%) em álcoois graxos, sendo composto por 67,4% de octacosanol.

Wada (2008) seguiu a mesma metodologia adotada por Rozário (2006), diferindo apenas na matéria-prima utilizada. O autor obteve um produto final com rendimento de 17,4%, teor em álcoois graxos de 90,0 a 96,0%, dos quais 65,2% correspondiam à fração de octacosanol.

Conforme destacado, a obtenção de policosanol pode ser realizada a partir das etapas de purificação e reação química de extratos lipídicos, principalmente dos obtidos a partir da extração por solvente, uma vez que é de baixo custo e de fácil operação. Mas o policosanol também pode ser obtido a partir da aplicação de outras

técnicas, conforme relatado por muitos autores (Jung et al., 2012; Ou et al., 2012; Ishaka et al., 2014; Attard et al., 2015 e 2016; Shen et al., 2019).

Extração supercrítica com dióxido de carbono é uma técnica moderna para isolar componentes bioativos, à medida em que é capaz de promover a obtenção do extrato de maneira rápida e sem a presença de solventes tóxicos (Shen et al., 2019). Dada as suas características, a extração supercrítica foi empregada para o isolamento do policosanol a partir de diferentes matérias-primas, como torta o filtro rotativo (1920,0 - 1297,0 mg.100g⁻¹), bagaço (46,7 - 91,4 mg.100g⁻¹), casca (220,8 mg.100g⁻¹) e folhas (61,4 mg.100g⁻¹) (Lucas et al., 2007; Ou et al., 2012; Attard et al., 2015) da cana-de-açúcar; palha do trigo (157,0 mg.100g⁻¹) (Sin et al., 2014); cera do chá da Índia (*Miscanthus sinensis*) (54,9 mg.100g⁻¹) e miscanto (*Miscanthus giganteus*) (79,3 mg.100g⁻¹) (Attard et al., 2016); cera do óleo de sementes de perilla (65,5 mg.100g⁻¹) (Jung et al., 2012), dentre outros.

De acordo com Attard et al. (2015), a partir da extração com fluido supercrítico podem ser extraídas quantidades maiores de ácidos graxos quando comparada com a extração com hexano, entretanto são obtidos maiores teores de policosanol a partir da extração com hexano. Ou et al. (2012) comparou o método de extração supercrítica com o refluxo com etanol a quente para isolar o octacosanol encontrada na cana-de-açúcar, observando rendimentos de 22,5 e 29,6 mg.100g⁻¹, respectivamente; demonstrando que a extração com etanol associada à saponificação foi capaz de propiciar rendimentos mais elevados de octacosanol.

O policosanol também pode ser obtido a partir da extração assistida por ultrassom que se baseia na aplicação de ondas (18 a 50 kHz) capazes de formar bolhas no solvente e, assim, produzir jatos de solvente de alta velocidade dentro da matéria-prima para penetrar nas paredes das células (Luque-Garcia e Luque de Castro, 2003; Roselló-Soto et al. 2015). A utilização desta técnica para o isolamento do octacosanol a partir de diferentes matérias-primas é relatada, tendo-se destaque o gérmen de trigo (6,3 mg.100g⁻¹), casca da cana-de-açúcar (27,0 mg.100g⁻¹), cera de abelha (1200 mg.100g⁻¹) (Irmak et al., 2006), folha da azeitona (46,5 mg.100g⁻¹), cera (10820,0 mg.100g⁻¹) e óleo (9810 mg.100g⁻¹) do farelo de arroz (Ishaka et al., 2014).

Há relatos também da obtenção de frações concentradas de octacosanol encontrado em ceras a partir do emprego da destilação molecular, que é uma técnica que se baseia na separação de compostos a partir do uso de alto vácuo (10⁻³ - 10⁻⁴ mmHg) e temperaturas mais brandas quando comparado aos processos

convencionais de destilação e evaporação (Batistella e Wolf-Maciel, 1996; Martins, 2006). Chen et al. (2005 e 2007), analisaram a cera do farelo de arroz, obtendo rendimento e teor de octacosanol de 51,1 - 53,9% e de 25,9 - 27,6%, respectivamente. Matkin et al. (2006) patentearam um processo de obtenção de álcoois e ácidos graxos oriundo de ceras de origem vegetal e animal, com rendimento da mistura de álcoois (C₂₄ a C₃₄) e ácidos graxos (C₂₂ a C₃₈) na faixa entre 17,0 e 46,3%, e com pureza de 96 a 98%, respectivamente. Lopes (2010) adaptou a metodologia patenteada por Rohr e Trujillo-Quijano (2000) para obter álcoois e ácidos graxos contido na cera da cana-de-açúcar, sendo observados rendimentos de concentrados de álcoois, ácidos graxos e resíduo com valores de 27,7, 23,4 e 48,9%, respectivamente.

A cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês: *High performance liquid chromatography*, HPLC) pode ser empregada para a análise do policosanol (Hwang et al., 2002c; Asikin et al., 2012), entretanto a utilização desta técnica para análise de ceras precisa ser melhor explorada, uma vez que apresenta algumas limitações principalmente associadas aos seus detectores. Os detectores mais utilizados para análise de HPLC são detectores de UV, entretanto os mesmos se apresentam inadequados para a análise de ceras, uma vez que estas não possuem cromóforos úteis que possam ser detectados (Hamilton, 1995; Hwang et al., 2002b). As ceras também não apresentam boa solubilidade em solventes e se solidificam facilmente à temperatura ambiente, podendo provocar um acúmulo de material na coluna de HPLC (Hwang et al., 2002c).

O uso de HPLC acoplado a um detector de dispersão de luz evaporativo (ELSD) com o aquecimento das colunas e linhas, é uma alternativa para a análise de ceras. Neste sentido Asikin et al. (2012) analisaram as diferenças de composição do talo e casca em oito culturas de cana-de-açúcar, observando que a cera era constituída de 55 - 60% de éster, aldeído e esterol, 32 - 40% de álcool graxo e pequenas quantidades de trioleína, ácidos e esteróis vegetais. Há relato também da utilização de HPLC para análise de cera do grão de sorgo, carnaúba, semente de perilla (Hwang et al., 2002c; Adhikari et al., 2006), dentre outros.

Rezanka e Sigler (2006) descreveram um método de enriquecimento de ácidos graxos de cadeia longa da cera da cana-de-açúcar e sua identificação como ésteres de picolinil, por HPLC acoplado a espectrômetro de massas com ionização química a pressão atmosférica (APCI) e, análise por HPLC-MS, sendo observada a presença de ácidos graxos de C₂₄-C₃₄ (98,72% do total de ácidos graxos) e C₃₅-C₅₀ (1,28%).

Além das técnicas citadas anteriormente, também há relatos da obtenção e/ou análise de policosanol a partir da extração por solvente pressurizado, cromatografia de camada delgada de alta performance (HPTLC), cromatografia de camada delgada (CCD ou *TLC*), hidrólise à quente por refluxo, dentre outros (Shen et al., 2019). A cromatografia a gás (CG) associada à espectrometria de massas (EM) é o método mais frequentemente utilizado para identificação e quantificação de álcoois graxos em diversas classes de lipídios, sendo necessária na maior parte dos métodos existentes, a derivatização prévia das amostras para possibilitar a detectabilidade no CG e melhora na resposta do detector, separação e simetria do pico.

A derivatização é uma reação química que modifica principalmente um determinado grupo funcional de um analito a fim de permitir separações cromatográficas (Orata, 2012). A derivatização é capaz de propiciar com que materiais com alta massa molar e grupos funcionais fortemente polares, como é o caso dos álcoois graxos, apresentem volatilidade suficiente para serem eluídos a temperaturas razoáveis, sem provocar a sua degradação térmica (Blau e Halket, 1993).

Para a análise por CG, os compostos contendo grupos funcionais com hidrogênios ativos, como -SH, -OH, -NH e -COOH causam grande preocupação à medida que apresentam a tendência de formar ligações de hidrogênio intermoleculares, afetando a volatilidade inerente ao componente, sua estabilidade térmica e tendência de interação com os materiais de empacotamento da coluna (Halket e Zaikin, 2003).

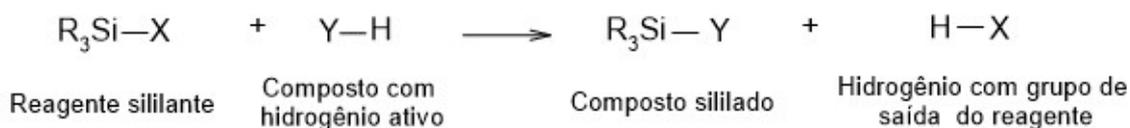
As reações de derivatização mais comumente utilizadas em análises por CG são as de alquilação, acilação e siliilação. A acilação é um tipo de reação em que um grupo acila é introduzido em um composto orgânico, podendo ser empregada para a conversão de compostos contendo hidrogênios ativos (ex. -OH, -SH e -NH) em ésteres, tioésteres e amidas, respectivamente (Orata, 2012). A alquilação consiste na substituição do hidrogênio ativo (ex. -COOH, -OH, -SH, -NH, -NH₂) por um grupo alquil, alifático ou alifático-aromático e, é muito empregada para a conversão de ácidos orgânicos em ésteres metílicos, que produzem cromatogramas melhores que os ácidos livres (Zenkevich, 2009).

Seguindo esta premissa Vieira (2003) e Rozário (2006) analisaram a composição de álcoois e ácidos graxos de ceras de cana-de-açúcar a partir da derivatização com reagente de Grignard, que reage com os grupamentos éster da cera, convertendo os ácidos graxos em álcoois terciários, enquanto os álcoois graxos

permaneceram como álcoois primários. Gandra (2006), Paixão (2008), Wada (2008) Lopes (2010), analisaram a composição dos álcoois e ácidos graxos da cera da cana-de-açúcar a partir da conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos, conforme metodologia de metilação proposta por Hartman e Lago (1973).

A sililação é o método de derivatização adequado para a análise de álcoois graxos por CG, uma vez que é simples, rápida e muito versátil. Este tipo de derivatização é caracterizado por ocorrer em uma única etapa, possibilitando altos rendimentos mesmo em condições brandas (Blau e Halket, 1993; Halket e Zaikin, 2003). Na reação de sililação ocorre a substituição dos hidrogênios ativos (em grupos -OH, -COOH, -NH, -NH₂ e -SH) por um grupo trimetilsilil [-Si(CH₃)₃], que promove uma redução de polaridade do composto e de suas ligações de hidrogênio (Orata, 2012). Esta reação se dá por meio da substituição nucleofílica de 2° ordem, onde o par de elétron do heteroátomo mais eletronegativo ataca o átomo de silício pela região de menor impedimento estérico. Derivados sililados são mais voláteis e estáveis, gerando sinais cromatográficos estreitos e simétricos. A reação geral para a formação do derivado sililado é apresentada na Figura 2.10.

Figura 2.10 - Representação genérica da reação de sililação



Fonte: Blau e Halket (1993)

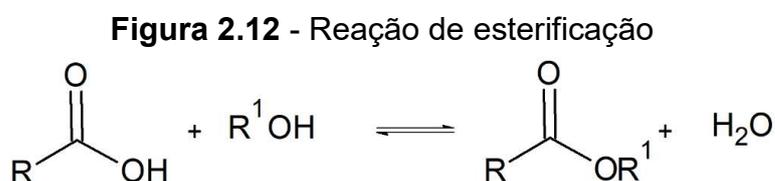
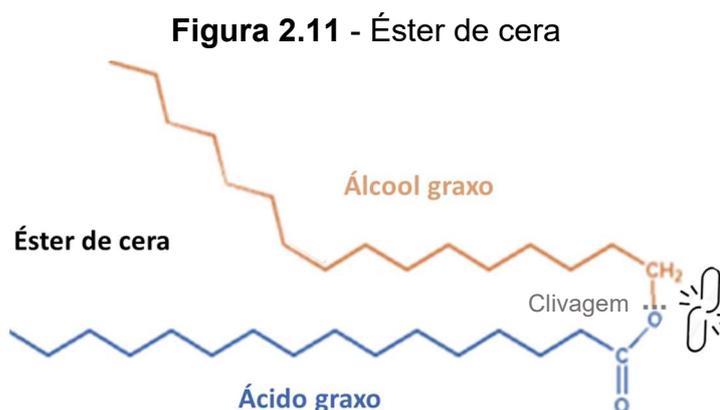
Os reagentes silílicos reagem com álcoois e ácidos para formar éteres trimetilsilílicos e ésteres trimetilsilílicos, respectivamente, que são derivados voláteis e, em sua maioria, facilmente separados (Orata, 2012). Dentre os reagentes de sililação existentes, a N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) é a mais volátil das trimetilsililacetamidas, sendo amplamente utilizada para análise de policosanol oriundo da cana-de-açúcar e de outros vegetais (Adhikari et al., 2006; Irmak et al., 2006; Lucas et al., 2007; Wang et al., 2007; Asikin et al., 2008 e 2012; Attard et al., 2015; Weerawatanakorn et al., 2016 e 2017).

2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA A PURIFICAÇÃO DO POLICOSANOL

O policosanol é comumente obtido a partir de fontes naturais, seguindo as etapas extração por solvente, purificação e reação química. Dentre as técnicas usualmente utilizadas para a purificação de produtos naturais, algumas técnicas já consolidadas industrialmente como a cromatografia contracorrente e cromatografia por coluna (Curling, 2007; Zobel et al., 2014), surgem como potenciais alternativas.

2.4.1 Reações de clivagem do éster

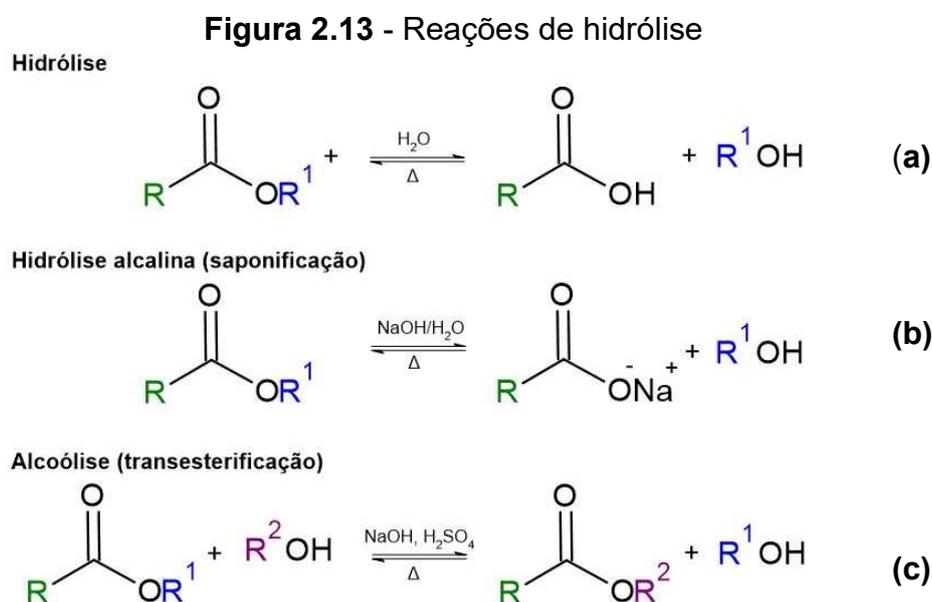
As ceras naturais consistem majoritariamente de ésteres (Figura 2.11), formados a partir da reação de esterificação (Figura 2.12) que ocorre entre álcoois e ácidos graxos de cadeia longa (Marinangeli et al., 2010). Logo, faz-se necessário o emprego de métodos que favoreçam a especificidade da reação para obter um produto mais enriquecido em policosanol (Ipatzi, 2016).



O procedimento mais utilizado para a obtenção de policosanol em ceras é através da reação reversa à esterificação, que é a hidrólise química dos ésteres de cera em condições alcalinas, seguida de extração sólido-líquido com solventes orgânicos para o isolamento do constituinte álcool graxo (Irmak et al., 2006; Wang et al., 2007). A hidrólise (Figura 2.13a) refere-se a reação química que envolve a quebra da ligação química de uma molécula com a adição de uma molécula de água.

Dependendo do meio em que o éster reage, a reação de hidrólise tem diferentes denominações, conforme apresentado na Figura 2.13.

A hidrólise alcalina dos ésteres é chamada de reação de saponificação (Figura 2.13b), e consiste na reação entre um éster (proveniente de um ácido e álcool graxo) em meio aquoso com uma base forte que agiliza a clivagem da ligação éster, liberando o ácido graxo como um sal orgânico (sabão) e um álcool (Sengupta et al., 2018). Logo, a partir da saponificação de uma cera é possível se obter frações solúveis em água (sais de ácidos graxos) e compostos orgânicos de cadeia longa (C₂₀- C₃₄), como o policosanol (fração insaponificada) (Shen et al., 2019).



2.4.1.1 Transesterificação

A reação química entre um éster e um álcool, formando diferentes ésteres e álcoois é chamada de transesterificação ou alcoólise, pois envolve a clivagem de um álcool (Figura 2.13c).

Geralmente, a transesterificação é realizada com álcoois de cadeia curta, ésteres de cadeia longa ou de alto massa molecular, além de catalisadores de diferentes classes. Metanol, etanol, propanol e butanol são os álcoois mais frequentemente utilizados nestes processos, sendo que o etanol é recomendado para processos ambientalmente amigáveis por ser derivado de produtos agrícolas e, alternativamente, o metanol é utilizado principalmente devido ao seu baixo custo, alta polaridade e reduzido tamanho de cadeia (Isahak et al., 2015). É recomendável a

utilização do álcool em excesso para aumentar o rendimento dos ésteres (Phukan, 2016).

Os catalisadores usados na transesterificação são classificados em três categorias: ácidos, alcalinos e enzimáticos (Miao et al., 2009). Os catalisadores alcalinos mais comumente utilizados são o hidróxido de sódio e de potássio, devido à sua ampla disponibilidade e baixo custo, enquanto os catalisadores ácidos podem ser o sulfúrico, clorídrico ou sulfônico orgânico (Islam e Khan, 2019).

2.4.1.1.1 *Catálise alcalina*

A reação de transesterificação catalisada por álcali é conhecida como o método convencional de transesterificação. A técnica popular para a clivagem do éster de cera em álcoois e ácidos graxos livres é o refluxo e, nestas reações são utilizadas bases fortes (NaOH ou KOH) como catalisadores, normalmente preparados a partir da utilização de solventes orgânicos como hexano, tolueno, benzeno, acetato de etila, etanol, metanol e acetona (Marchetti et al., 2007; Srisaipet et al., 2016). Entretanto, a utilização da solução de NaOH em etanol apresenta a vantagem de proteger a possível formação de emulsões da reação (Srisaipet et al., 2017).

Diversos autores realizaram estudos acerca do processamento de ceras a partir da transesterificação por via alcalina. Neste sentido, Deepam e Arumughan (2012) avaliaram o teor de policosanol contido no óleo refinado e bruto do farelo de arroz após ser submetido à etapa de saponificação, observando valores de 25,8 e 11,5 mg.g⁻¹, correspondendo a 43,4 e 28,5% dos constituintes do óleo, respectivamente.

Wang et al. (2007) utilizaram cromatografia a gás para avaliar os componentes do policosanol extraído da cera do farelo de arroz, observando que a saponificação “à seco”, utilizando hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) e posterior refluxo com etanol a 95%, produziu a maior quantidade de octacosanol (10,5%) dentre os quatro diferentes métodos de saponificação utilizados. Foi observado rendimento de policosanol de 20,2% para a saponificação com álcool (etanol), 28,0% e 21,0% para saponificação em água (neutralizada e não neutralizada, respectivamente), 18,0% para saponificação “a seco”, e 21,0% para a transesterificação utilizando butanol.

Harrabi et al. (2009) analisaram a composição do policosanol encontrado no óleo de milho a partir da saponificação do extrato oleoso, juntamente com KOH etanólico (12%, m/v) e aquecimento. Após resfriamento, foi adicionado água e a matéria insaponificável foi extraída quatro vezes com éter de petróleo e, o extrato

etéreo combinado foi lavado com EtOH:H₂O (1:1, v/v). O teor total de policosanol nas amostras variou de 15,2 a 20,5 mg.kg⁻¹ de grãos de milho.

Srisaipet et al. (2016) purificaram a cera de abelha a partir da dissolução da amostra em hexano, seguida de refluxo e lavagem com isopropanol para a remoção de triglicerídeos e ácidos graxos livres, o que foi confirmado com a análise por CCD. A cera purificada foi hidrolisada com 0,5 M KOH em 80% de etanol em um instrumento ativado por micro-ondas, obtendo um rendimento de policosanol de 14,6%, que apresentou porcentagem relativa de octacosanol de 20,0%.

Srisaipet et al. (2017) realizaram a transesterificação da cera com 1,0 M NaOH em etanol e, posterior purificação com acetona, heptano e água quente. Foi observado que o solvente utilizado na 1ª etapa de purificação, a acetona, possuía uma alta constante dielétrica, e não seria adequada para purificar o policosanol. A utilização de um solvente de baixa constante dielétrica (heptano) na segunda etapa da purificação foi capaz de extrair o policosanol de modo eficiente, eliminando assim o sal de sódio residual do ácido graxo, o que pôde ser confirmado por CCD. A pureza do policosanol foi confirmada por HPLC, observando rendimento variando de 13,2 a 13,9%.

Ramos-Zambrano et al. (2019) realizaram a hidrólise alcalina por três vias para investigar sua eficácia na extração de policosanol a partir de resíduos cerosos de cochonilha. Foi realizada a saponificação com extração por clorofórmio (com NaOH 20%, m/v) (método A), transesterificação (KOH e etanol) e extração com acetato de etila (método B) e saponificação com extração por hexano (com NaOH 12%, m/v) (método C). Os maiores rendimentos de policosanol foram observados a partir da utilização do método A (47%), porém a maior pureza de policosanol foi observada no extrato obtido pelo método C (69%).

A transesterificação catalisada por álcalis são as mais comuns, uma vez que as condições de reação são moderadas e o processo é mais rápido do que a catalisada por ácido (Marchetti et al., 2007; Miao et al., 2009), podendo ser cerca de 4.000 vezes mais rápida do que a mesma (Loterio et al., 2005; Islam e Khan, 2019). Entretanto, a transesterificação química depende muito da pureza do material reagente, especialmente do teor de ácidos graxos livres (AGL) (Sebastian et al., 2016). Recomenda-se a realização da reação de transesterificação utilizando catalisadores alcalinos, com materiais contendo teores de AGL inferiores a 0,5% (m/m) (Loterio et al., 2005; Ehimen et al., 2010). Quanto maior a acidez de um material, menor a eficiência de conversão (Islam e Khan, 2019).

A transesterificação alcalina de materiais com teores de AGL superiores a 0,5% resulta na reação parcial de saponificação, o que leva à formação de sabão e à dificuldades na separação e purificação do material de interesse, fazendo com que os custos do processo sejam elevados (Miao et al., 2009; Ehimen et al., 2010).

Também é desejável nestes tipos de reação que o teor de água no álcool e catalisador seja inferior a 0,3% (m/m). Como estas reações são muito sensíveis a pequenas quantidades de água ou umidade, a sua presença pode promover a hidrólise dos ésteres e, conseqüentemente, o efeito adverso da formação de sabão (Kusdiana e Saka, 2004; Sebastian et al., 2016).

A conversão de ácidos graxos livres em ésteres, por via alcalina, pode ser feita a partir de dois estágios. Inicialmente é realizada a pré-esterificação dos ácidos graxos livres por catálise ácida, de modo a convertê-los em ésteres metílicos de ácidos graxos e, na sequência realizada a transesterificação do éster por via alcalina (Islam e Khan, 2019). Entretanto, a utilização deste processo integrado de pré-esterificação e transesterificação fazem com que o processo seja mais dificultoso e com maiores custos de produção associados. A transesterificação catalisada por ácido apresenta a vantagem de não ter o seu desempenho fortemente afetado pela presença de ácidos graxos livres, uma vez que promove a catalisação simultânea da reação de esterificação e transesterificação (Loterio et al., 2005).

2.4.1.1.2 Catálise ácida

As exigentes especificações de matéria-prima para reações catalisadas por álcalis levaram os pesquisadores a buscar alternativas catalíticas e de processamento que pudessem aliviar essa dificuldade e reduzir os custos de produção (Sebastian et al., 2016). Metodologias baseadas em reações catalisadas por ácidos têm o potencial de conseguir isso, uma vez que os catalisadores ácidos não mostram suscetibilidade mensurável aos AGLs e são capazes de conduzir simultaneamente as reações de esterificação e transesterificação (Harrington e D'Arcy-Evans, 1985; Goff et al., 2004).

Nestas reações a taxa de transesterificação é bem mais lenta do que a de esterificação, o que leva alguns pesquisadores a optarem por um processo de duas etapas para as matérias-primas com altos teores de AGL (esterificação de AGL com catalisador ácido seguido por transesterificação alcalina), uma vez que os tempos totais ainda podem ser mais curtos do que a catálise ácida em uma única etapa (Kaewkool et al., 2009).

A catálise ácida de matrizes lipídicas geralmente é realizada utilizando ácidos inorgânicos como os ácidos sulfúrico e clorídrico, devido à insensibilidade destes ácidos ao conteúdo de AGL (Ehimen et al., 2010). Estes catalisadores fornecem um alto rendimento em ésteres, porém estas reações requerem condições mais drásticas de temperatura e pressão, à medida em que são mais lentas do que as catalisadas por álcali (Loterio et al., 2005; Marchetti et al., 2007; Li e Rudolph, 2008).

Estas reações consistem na solubilização dos lipídios, seguida pela liberação dos ácidos graxos, de modo a transferir um grupo metil do álcool (metanol ou etanol) para as cadeias acil dos lipídios (Kaewkool et al., 2009). Reações catalisadas por ácidos (ácido sulfúrico) já foram realizadas em diferentes matérias-primas, como óleo de semente de algodão, amendoim, soja, girassol (Freedman et al., 1984; Harrington e D'Arcy-Evans, 1985; Goff et al., 2004; Marchetti e Errazu, 2008; Miao et al., 2009), seringueira (Sebastian et al., 2016), microalga *Chlorella* (Ehimen et al., 2010; Jesus et al., 2019), dentre outros.

Embora não tenha sido avaliado o teor de álcoois graxos, Oliveira (2011) estudou a viabilidade em transformar o óleo de cera de cana-de-açúcar em ésteres etílicos (biodiesel) através de uma catálise ácida. As reações de esterificação e transesterificação foram realizadas utilizando ácido sulfúrico concentrado, sendo possível observar que a banda de FTIR característica de ácidos graxos era inexistente após reação.

Ainda não há relatos do emprego da transesterificação ácida aplicada à cera da cana-de-açúcar para a obtenção de policosanol. Entretanto, após Ipatzi (2016) realizar a transesterificação alcalina da cera de abelha e de cochonilha para obter o policosanol, o autor observou que a metodologia empregada não foi muito indicada. O autor acredita que a reação não tenha ocorrido de forma completa já que era possível observar, a partir de espectros de FTIR, a banda característica de ácidos graxos após a reação, sugerindo que a catálise por via ácida poderia ser uma alternativa mais eficiente para a conversão completa da reação.

2.4.2 Cromatografia contracorrente

A cromatografia contracorrente (CCC) ou cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) surge como uma alternativa rápida, limpa e de baixo custo nos processos de extração e purificação de uma diversidade de componentes químicos (Queiroga et al., 2014; Luca et al., 2019).

O sistema HSCCC é uma técnica de partição líquido-líquido, como aquela que ocorre em um funil de separação, em que um composto é distribuído entre as duas fases líquidas imiscíveis (Winterhalter, 2007). O transporte ocorre de forma contracorrente, por meio de um equilíbrio hidrodinâmico entre as fases, onde duas fases imiscíveis passam umas pelas outras por tubos de PTFE (politetrafluoroetileno) ou aço inox enrolados em uma bobina e, saem em extremidades opostas da coluna (Ito et al., 2006a). Um líquido atua como fase estacionária, ficando retido na coluna devido às forças centrífugas atuantes, enquanto a fase móvel circula através da mesma e os componentes são separados de acordo com suas respectivas solubilidades nas duas fases (Ito, 2005).

As principais vantagens de utilização do sistema HSCCC, frente às outras técnicas cromatográficas, estão relacionadas com a ausência de um suporte sólido para a fase estacionária, permitindo a recuperação da amostra injetada e evitando a adsorção irreversível de analitos, o que pode levar a um esgotamento do suporte e perda de amostra (Ito, 2005; Yu, et al., 2017; Khan e Liu et al., 2018).

Sua utilização ainda é capaz de proporcionar uma rápida separação, boa reprodutibilidade, redução do volume de solvente, facilidade de escalonamento, capacidade de utilização de grandes quantidades de amostra, disponibilidade de utilização de diferentes sistemas de solventes e modos de eluição, um custo operacional reduzido, já que permite a injeção direta do extrato bruto sem necessidade de pré-tratamento, além também do menor consumo de solvente por carga de amostra processada, quando comparado com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Ito, 2005; Friesen et al., 2015; Yu, et al., 2017; Khan e Liu et al., 2018).

Para fornecer a seletividade adequada para a separação, a etapa de seleção do sistema de solventes é crucial (Ito e Conway, 1996, Liu et al., 2015). Neste tipo de cromatografia deve-se escolher os solventes que compõem a fase estacionária e a móvel em uma mesma etapa, em que é avaliada a natureza e a proporção de cada solvente, já que as fases são dependentes entre si e a composição de cada uma está relacionada ao equilíbrio formado entre ambas em um sistema de diferentes solventes (Friesen e Pauli 2005).

A estratégia de seleção do sistema de solvente bifásico para aplicação em HSCCC é realizada a partir da escolha de famílias de solventes, que são compostas dos mesmos solventes misturados em proporções variáveis. As famílias mais comuns são formadas por hexano/acetato de etila/metanol/água (HEMWat),

clorofórmio/metanol/água (ChMWat) e heptano/acetato de etila/metanol/água (família “Arizona”) (Friesen e Pauli, 2007). De um modo geral, quando não se conhece o comportamento dos constituintes da amostra, inicia-se os testes a partir de uma mistura de solventes de composição intermediária. No caso da família HEMWat, por exemplo, é indicado iniciar os testes com o sistema formado por hexano:acetato de etila:metanol:água (1:1:1:1) (Garrard, 2005). Vale salientar que a qualidade e temperatura do solvente podem influenciar significativamente a formação do sistema.

A seleção de um sistema de solventes adequado pode ser realizada a partir da determinação dos valores de coeficiente de partição (K_D) em experimentos de partição ou dos coeficientes de retenção (R_f) obtidos a partir da realização de cromatografia em camada delgada (CCD) (Friesen et al., 2015). É desejável que os valores de K_D estejam entre 0,5 e 1,0 para que haja uma boa separação (Ito, 2005). O coeficiente de partição é calculado como a razão entre a concentração do soluto na fase estacionária por aquela na fase móvel. Um valor de K_D baixo ($0,5 \leq K_D \leq 0,0$) indica uma maior afinidade do soluto pela fase móvel, o que resulta em uma perda de resolução de pico, enquanto um valor mais alto está associado à maior interação com a fase estacionária, levando a tempos de corrida mais longos, e conseqüente alargamento excessivo da banda (Friesen e Pauli, 2005; Khan e Liu et al., 2018).

Devido a uma série de características favoráveis, o sistema HSCCC tornou-se uma técnica amplamente usada em processos de extração e purificação de um grande variedade de produtos naturais (Ito, 2005), incluindo vitaminas (Kurumaya et al., 1988), proteínas (Mekaoui et al., 2012), DNA (Kendall et al., 2001), antibióticos (McAlpine et al., 2012), produtos naturais (Friesen et al., 2015), produtos farmacêuticos (Hochlowski et al., 2009; Sumner, 2011), íons metálicos (Araki et al., 1998; Jin et al., 2000), elementos raros (Shimizu et al., 2013), pesticidas (Ito et al., 2008), enantiômeros (Berthod, 2010; Huang e Di, 2015), peptídeos (Knight et al., 2011), hidrocarbonetos poliaromáticos (Cao et al., 2012), enzimas ativas (Baldermann et al., 2011), alcaloides (Cruz et al., 2016), flavonoides (Tang et al., 2015), terpenos e terpenóides (Queiroga et al., 2014; Yu, et al., 2017), fenóis (Shu et al., 2014), dentre outros.

Como a técnica de HSCCC é ideal para amostras contendo baixas quantidades de material de partida, já que pouco ou nenhum material se perde após a separação (Deamicis et al., 2011), a utilização desta técnica para o isolamento de policosanol a

partir da cera da cana-de-açúcar aparece como uma alternativa promissora, embora ainda não exista relatos na literatura da aplicação da técnica de HSCCC para este fim.

2.4.2.1 Uso de cromatografia em camada delgada para a determinação do perfil cromatográfico de ceras

A escolha de um sistema solvente adequado para cromatografia contracorrente é um passo crítico na purificação de produtos naturais. De acordo com Friesen e Pauli (2005), a análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (*Thin Layer Chromatography - TLC*) pode ser útil para predizer de forma rápida e prática, um sistema de eluentes capaz de propiciar uma boa separação na técnica de HSCCC.

Alguns autores realizaram estudos utilizando CCD para avaliar a presença de álcoois graxos a partir de diferentes fontes. Neste contexto, Hwang et al. (2002a) analisaram a composição da cera do grão de sorgo utilizando vários eluentes, sendo estes, hexano:éter etílico (92:8, 94:6 e 98:2, v/v), hexano:éter etílico:ácido acético (85:15:2 e 88:12:2, v/v/v), hexano:éter etílico:acetaldeído (95:5:2, v/v/v) e clorofórmio:acetona (98:2, v/v). As bandas reveladas foram visualizadas mergulhando a placa numa solução de 10 g de sulfato cúprico dissolvido em 100 mL de ácido fosfórico a 8% e aquecendo-o num forno a cerca de 150 °C, sendo possível observar a presença de bandas características de álcoois, ácidos, aldeídos, além de outros componentes em menores concentrações.

Hwang et al. (2005) e Adhikari et al. (2006) seguiram a mesma metodologia adotada por Hwang et al. (2002a) para a análise da cera extraída de cereais coreanos e sementes de perilla, respectivamente, utilizando a mistura de eluentes composta por hexano:éter etílico:ácido acético (85:15:2, v/v/v). Hwang et al. (2005) dissolveram a cera em hexano para análise por CCD ($\approx 100 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) e, identificaram a presença de aldeídos, policosanol, hidrocarbonetos e ésteres. Jung et al. (2011) e Choi et al. (2016) também aplicaram a metodologia adotada por Hwang et al. (2002a), porém utilizando a mistura de hexano:éter etílico (90:10, v/v) para a análise do policosanol presente na sementes de cereais e nas folhas do chá-verde, respectivamente.

Asikin et al. (2012) realizou algumas modificações na metodologia adotada por Hwang et al. (2002a) para análise dos constituintes encontrados na cera da cana-de-açúcar. As amostras e padrões foram eluídos utilizando duas misturas de eluentes. Inicialmente foi utilizada hexano:éter etílico:ácido acético (95:5:1, v/v/v), até que as amostras eluíssem por aproximadamente 10 cm e, na sequência a placa foi

novamente desenvolvida em hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1, v/v/v). Os componentes principais observados foram esteróis, álcoois, ácidos, trioleína, além de ésteres metílicos, aldeídos, e éster de esteroide em menores concentrações.

Harrabi et al. (2009) e Cherif et al. (2010) analisaram as frações insaponificáveis contendo policosanol do óleo extraído a partir de grãos de milho e amendoim, respectivamente, utilizando hexano:éter etílico (65:35, v/v). Para a identificação das bandas dos álcoois alifáticos foi utilizado 1-eicosanol como amostra de referência e, as placas foram pulverizadas com diclorofluoresceína para visualização sob luz UV.

Deepam e Arumugan (2012) analisaram o material insaponificável contido no óleo do farelo de arroz. Foi utilizado como eluente hexano:éter etílico:ácido acético (8:2:0,1, v/v/v), sendo observado que o policosanol e aldeídos foram eluídos como uma única banda (R_f de 0,56). O policosanol e aldeídos foram separados a partir da utilização de tolueno:clorofórmio (7:3, v/v), apresentando bandas com R_f de 0,52 e 0,68, respectivamente.

Para a análise da composição da cera de abelha por CCD, Srisaipet et al. (2016 e 2017) utilizaram como padrões, o óleo do farelo de arroz (indicativo de triglicerídeos), ácido esteárico padrão (ácido graxo livre) e éster metílico de ácido esteárico (éster metílico de ácido graxo). Foi utilizado hexano:acetato de etila:ácido acético (90:9:1, v/v/v) como eluente e as bandas foram desenvolvidas por ressublimação de iodo. Embora os respectivos autores tenham utilizado o vapor de iodo como método de visualização, o mesmo não é adequado para a identificação dos componentes de ceras, uma vez que as mesmas contêm poucas ligações duplas, sendo mais adequada a utilização dos métodos de carbonização (Hwang et al., 2002b).

Ramos-Zambrano et al. (2019) analisaram o policosanol contido na cera residual da cochonilha utilizando hexano:éter etílico:ácido acético (85:15:2, v/v/v); enquanto Lukic et al. (2015) analisaram o perfil cromatográfico do azeite de oliva contendo policosanol utilizando hexano:éter etílico (65:35, v/v).

Gao et al. (2015) relataram o isolamento do octacosanol contido no krill antártico (*Euphausia superba Dana*) a partir da utilização da mistura composta por éter de petróleo:acetato de etila:tolueno (4:1:0,05, v/v/v); enquanto Nandini et al. (2012) utilizaram a mistura de tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (4,5:4,5:1, v/v/v) para análise do octacosanol contido no Guduchi (*Tinospora cordifolia Miers*).

A técnica de CCD tem sido utilizada como uma ferramenta confiável para visualizar o perfil cromatográfico de ceras usando diferentes eluentes (Hwang et al., 2002b), logo, a escolha adequada do eluente para o desenvolvimento da análise é de suma importância para uma boa separação dos constituintes das ceras.

2.4.3 Cromatografia em coluna

Na extração de ceras, uma quantidade considerável de pigmentos, açúcares, lipídios e outros materiais são extraídos simultaneamente, e estes materiais podem interferir na posterior separação e identificação dos álcoois graxos. Em geral, os compostos interferentes podem ser removidos pela extração entre dois solventes imiscíveis ou por cromatografia em coluna. A cromatografia em coluna empregando como adsorvente sílica gel (63 - 200 μm) é uma das técnicas mais utilizadas na purificação de produtos naturais, uma vez que é capaz de possibilitar a separação de substâncias interferentes que dificultam a análise de um analito de interesse (Barreto Jr et al., 2005; Lucas, 2015).

O princípio de separação desta técnica ocorre principalmente em função das diferentes interações entre a amostra com a fase móvel e estacionária (Barreto Jr et al., 2005; Snyder et al., 2011), ocasionada devido ao fenômeno de adsorção em que as moléculas são constantemente adsorvidas a partir da solução e simultaneamente dessorvidas de volta à solução (Collins et al., 2007; Skoog et al., 2008).

A separação dos componentes por coluna cromatográfica ocorre a partir da migração da fase móvel por um tubo de vidro, em posição vertical, preenchido com um material adsorvente como sílica gel (ou outra fase estacionária) e que possui extremidade superior aberta e inferior terminando numa torneira, que permite o controle do volume das frações a serem recolhidas (Collins et al., 1997). A amostra a ser separada é adicionada no topo da coluna e o fluxo contínuo do solvente elui, ou extrai os solutos por meio da gravidade. A medida que os compostos da mistura são separados de acordo ordem crescente de polaridade, há formação de bandas que são removidas no fundo da coluna (Engel et al., 2012; Lucas, 2015; Skoog et al., 2008).

O fracionamento de ceras naturais a partir de colunas empacotadas vem sendo realizado desde os anos 60 (Scott, 1960; Ludwig, 1965). Neste sentido alguns autores avaliaram o fracionamento de ceras vegetais, como Henon (1986), que avaliou a separação de ésteres de cera do óleo de girassol em uma coluna mista de sílica e sílica impregnada com nitrato de prata, relatando a presença de ácidos (C_{16} - C_{32}) e

álcoois graxos (C₁₆-C₃₂). Hwang et al. (2002a) realizaram o fracionamento de aldeídos por cromatografia em coluna de sílica gel da cera extraída do grão de sorgo a partir uma série de misturas de hexano, clorofórmio, metanol e ácido acético.

Fracionamento da cera de abelha por cromatografia em coluna de sílica gel foi avaliado por Ebrahim (2015), sendo observadas frações contendo 15,5 a 17,3% de hidrocarbonetos e 47,7 a 49,9% de ésteres, quando utilizado hexano e diclorometano como eluentes, respectivamente. Milani et al. (2020) avaliaram o fracionamento da cera do óleo de oliva a partir da cromatografia em coluna de sílica eluída com uma mistura de isooctano:éter etílico (99:1, v/v). Os autores obtiveram frações concentradas de éster variando de 328,5 a 335,9 mg.kg⁻¹ de cera, o que corresponde a uma recuperação de 98,1 a 100,3%, respectivamente.

A cromatografia *flash* difere da técnica convencional principalmente em decorrência do emprego de sílica gel com menor granulometria (40 - 63 µm). O emprego desta técnica requer o uso de pressão externa no topo da coluna para acelerar a eluição do solvente, uma vez que as partículas menores tem uma maior superfície de contato, possibilitando uma eficiência de eluição mesmo com velocidades maiores (Barreto Jr et al., 2005; Snyder et al., 2011). Desta forma, a cromatografia em coluna *flash* é uma técnica rápida, que permite separar misturas complexas de compostos com uma alta resolução.

A literatura tem apresentado variações da técnica de cromatografia *flash*, como por exemplo o fracionamento em coluna cromatográfica com sílica impregnada com KOH. Neste sentido, McCarthy e Duthie (1962) propuseram o uso da sílica impregnada com KOH para a separação de ácidos graxos, sendo adaptada por Ramljak et al. (1977), Pinto et al. (1997) e, Braga et al. (1998) e Pinto et al. (2000), para a separação de ácidos a partir de asfaltos; óleos de *Vellozia flavicans* e *Copaifera cearenses*, respectivamente. Todas essas metodologias foram descritas como eficazes para o isolamento de ácidos orgânicos das mais diferentes origens.

O emprego de fase estacionária que possibilite troca iônica é uma excelente alternativa para o isolamento de substâncias ácidas ou alcalinas, uma vez que podem ser minimizados os inconvenientes ocorridos durante a partição líquido-líquido e ácido-base, como a formação de emulsões de difícil separação (Barreto Jr et al., 2005). Neste sentido, o emprego de colunas cromatográficas apresenta-se como uma promissora alternativa para promover a purificação dos constituintes majoritários (ésteres, ácidos e álcoois graxos) da cera da casca da cana-de-açúcar.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, foi apresentada uma revisão da literatura acerca dos principais tópicos relacionados a este trabalho, que compreendem o destaque do Brasil no agronegócio mundial devido a produção de altos volumes de cana-de-açúcar, sendo este um potencial produtor da cera da cana-de-açúcar e, conseqüentemente, do policosanol que apresenta diversos benefícios da promoção da saúde humana.

A literatura evidenciou que foram feitos muitos esforços na tentativa de se obter frações enriquecidas de policosanol a partir de ceras de diferentes fontes naturais, sendo exploradas diversas tecnologias de separação e purificação da mesma. Entretanto, como a cera se trata de uma mistura complexa de constituintes, alguns inconvenientes limitam a obtenção de policosanol, sendo necessário o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e viáveis para promover esta separação. Reações de clivagem, cromatografia contracorrente e separação por colunas apresentam-se como potenciais alternativas de purificação do policosanol encontrado na cera da cana-de-açúcar.

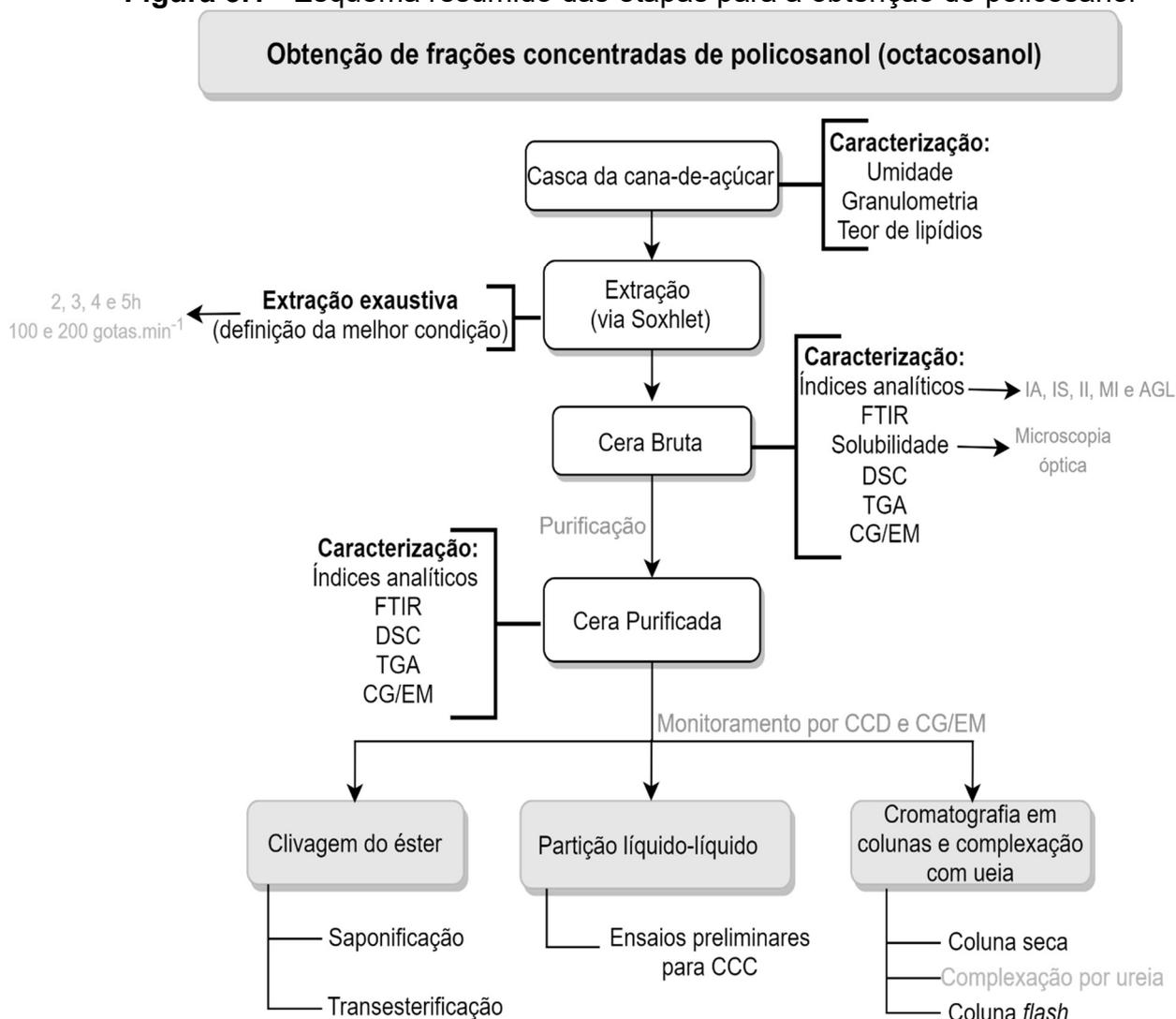
Neste sentido, este estudo pretende contribuir com o desenvolvimento de tecnologia de separação e concentração do policosanol oriundo de um resíduo agroindustrial (casca da cana-de-açúcar), a partir da realização de reações de clivagem de ésteres, testes preliminares de partição líquido-líquido visando o emprego de HSCCC e cromatografia em coluna (seca e *flash*), permitindo estudos posteriores visando a produção em larga escala do policosanol.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo são apresentados os procedimentos adotados para a extração e purificação da cera e, posterior obtenção de frações concentradas de octacosanol, que levaram a cumprir os objetivos propostos neste trabalho. As técnicas de caracterizações da matéria-prima e das ceras são detalhadas a fim de permitir a reprodutibilidade dos experimentos. Um esquema das etapas seguidas para a obtenção do policosanol (octacosanol) está brevemente ilustrado pela Figura 3.1.

Figura 3.1 - Esquema resumido das etapas para a obtenção do policosanol



Legenda: IA: índice de Acidez; IS: Índice de Saponificação; II: Índice de Iodo; MI: Índice de Matéria Insaponificável; AGL: Teor de Ácidos Graxos Livres; FTIR: Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier; DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial; TGA: Análise Termogravimétrica; CG/EM: Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas; CCD: Cromatografia em Camada Delgada; CCC: Cromatografia Contracorrente.

3.1 MATÉRIA-PRIMA

As matérias-primas com potencial para a extração de cera disponíveis para a realização deste trabalho foram as mesmas avaliadas por Oliveira (2018): casca da cana-de-açúcar e a torta do filtro rotativo, com teor total de lipídios de $7,85 \pm 0,19\%$ e $2,68 \pm 0,12\%$, respectivamente. Por apresentar maior teor total de lipídios e valores mais próximos aos relatados na literatura (de 4 a 14%) (Paturau, 1989; Solomon, 2011), optou-se por conduzir este estudo utilizando a casca da cana-de-açúcar.

A casca da cana-de-açúcar utilizada (variedade RB 96 6928, safra 2018/2019, Rio Claro, SP, Brasil) é proveniente da raspagem da cana-de-açúcar para produção de garapa. Por apresentar alto teor de umidade, a casca foi seca em condições ambientais, conforme apresentado na Figura 3.2, até apresentar teores de umidade inferiores a 11%, que é o recomendado para favorecer o processo de extração e também evitar a proliferação de fungos e insetos (Akoh e Min, 2002).

Figura 3.2 - Secagem da casca da cana-de-açúcar



3.1.1 Caracterização

Como a composição da casca da cana-de-açúcar e, conseqüentemente de sua cera, pode variar muito de acordo com a variedade da cana, safra, condições de cultivo, grau de maturação, entre outros; a etapa de caracterização da matéria-prima é de suma importância ao se trabalhar com materiais vegetais e de composição tão heterogênea.

3.1.1.1 Distribuição granulométrica

As partículas da casca da cana-de-açúcar foram avaliadas em relação à frequência (%) de ocorrência de seus diâmetros médios e também da frequência acumulada, permitindo identificar os valores de d_{10} , d_{50} e d_{90} , correspondente ao tamanho de partícula inferior a 90%, 50% e 10% do volume total da amostra, respectivamente.

Foram utilizadas seis peneiras (Granutest) da série Tyler para conduzir os ensaios, realizados em triplicata. A escolha das peneiras foi realizada para possibilitar uma diferença de diâmetro de abertura igual à razão de $\frac{1}{2}$ entre as mesmas. Para tal, foram utilizadas peneiras 16, 32, 60, 115, 250 e 400 Tyler, que correspondem, às aberturas de 1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 e 0,037 mm, respectivamente. A análise granulométrica foi realizada a partir da agitação de $20 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de amostra por 20 min em um agitador eletrostático (Produtest).

3.1.1.2 Teor de umidade

A umidade da amostra foi determinada a partir de uma balança de umidade por infravermelho (Shimadzu, MOC63u), que se baseia no princípio da perda de massa relativa ao teor de umidade. Para tal, a balança foi programada com taxa de aquecimento a $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, até alcançar a temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$, a partir da utilização de uma lâmpada de halogênio. Foi utilizado cerca de 3 g de amostra para cada ensaio, e os mesmos foram realizados em triplicata. O tempo de análise variou conforme a umidade da amostra, sendo de aproximadamente 2 min.

3.1.1.3 Teor de lipídios totais

A determinação dos lipídios totais (polares, apolares, extra e intracelular) foi realizada para quantificar os lipídios contidos na matéria-prima, além de indicar a viabilidade de utilização deste material para a extração de cera. Para essa determinação, foi utilizado o método Bligh e Dyer (1959) modificado segundo Rios (2015), que consiste em etapas de digestão ácida e extração de lipídios.

Para a etapa de digestão ácida, foi utilizado 500 mg de casca seca, pesada em uma balança analítica (Shimadzu, ATX 224), com acurácia de 0,0001 g. Foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico 2 M à casca seca, sendo homogeneizada por 2 min em um agitador vórtex (Fisaton, modelo 772), e submetida a um banho a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h para a digestão da parede celular da planta. Na sequência, o tubo contendo o

material foi resfriado e centrifugado (centrífuga Kasvi, K14-4000) (2000 rpm por 15 min), descartando-se o líquido sobrenadante.

Após a digestão ácida da parede celular, foi realizada a extração lipídica. Para tal, a casca digerida foi misturada com 4 mL de metanol (PA), 2 mL de clorofórmio (PA) e 3,6 mL de água destilada. Esta mistura foi homogeneizada no agitador vórtex (5 min) e centrifugada (2000 rpm, 15 min), sendo retirada a fase inferior do tubo contendo o clorofórmio e os lipídios e, transferida para uma placa de Petri. O sobrenadante foi lavado com 4 mL de solução de metanol em clorofórmio (10%, v/v), seguida de homogeneização no vórtex e centrifugação, para ser removida novamente a parte precipitada.

Após a evaporação do clorofórmio presente no extrato, o percentual de lipídios totais (*LT*) presentes na amostra foi determinado, em triplicata, conforme Equação 1.

$$LT (\%) = \frac{m_E}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

em que, m_E , é a massa do extrato residual do processo de digestão ácida, extração do lipídio e evaporação do clorofórmio e; m_0 , a massa inicial de matéria-prima.

3.2 EXTRAÇÃO DA CERA BRUTA

O processo de extração de cera foi realizado utilizando hexano como solvente em um extrator tipo Soxhlet (600 mL) acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 1 L, conforme apresentado na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Sistema Soxhlet utilizado para a extração da cera da casca da cana-de-açúcar



As condições do processo de extração (tipo de solvente, temperatura de extração, relação entre solvente e soluto, tempo de extração) e das características do material (tamanho de partícula e umidade) são parâmetros críticos que afetam significativamente os componentes extraídos de uma determinada matriz (Karnofsky, 1949; Bernardini, 1976).

Como era desejada a obtenção de um material com características comparáveis aos materiais apresentados na literatura, neste estudo foi utilizado o hexano como solvente extrator, uma vez que este solvente é comumente utilizado na indústria de óleos e gorduras (Thomas, 1985).

Foram realizadas extrações utilizando de 100 g de casca e 800 mL de hexano, sendo avaliadas diferentes condições de tempo de extração (2, 3, 4 e 5 h) e potência da manta aquecedora que possibilitasse a contagem de 100 e 200 gotas.min⁻¹. Como os rendimentos e composições das ceras podem diferir de acordo com a condição de extração, foi desenvolvido método para a padronização do controle do aquecimento da manta por meio da contagem do gotejamento de solvente no corpo do extrator Soxhlet.

Após o processo de extração, o excesso de solvente contido no extrato de cera foi recuperado a partir de um evaporador rotativo à vácuo com banho a 40 °C e, os extratos obtidos foram secos sob condições ambientes por aproximadamente 24 h para eliminar o solvente residual. O rendimento de cera bruta (R_B) foi calculado conforme Equação 2.

$$R_B(\%) = \frac{m_c}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

onde, m_c é a massa do extrato de cera após a eliminação do solvente residual e m_0 é a massa inicial de matéria-prima utilizada.

Definida a melhor condição, foram realizadas várias extrações de um mesmo lote de casca de cana-de-açúcar e, as amostras resultantes foram homogeneizadas e utilizadas para posterior purificação e caracterização.

3.2.1 Extração exaustiva

Para a determinação da melhor condição de extração em relação ao rendimento bruto, foi realizada a extração exaustiva da matéria-prima, variando-se o tempo de extração e o gotejamento (n° de gotas.min⁻¹). O principal objetivo das

técnicas exaustivas é causar o esgotamento da matriz, de modo a remover completamente os analitos de uma matriz de amostra e transferi-los para a fase de extração. Para tal, foram realizadas três extrações consecutivas da mesma matriz. Inicialmente foi realizada a extração da cera, seguida da concentração e pesagem do extrato, obtendo assim a massa do extrato 1 (m_1). Foi realizada uma segunda extração da torta residual, para obtenção da massa do extrato 2 (m_2) e, na sequência, uma terceira extração, para se conhecer a massa do extrato 3 (m_3).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CERAS

A fim de caracterizar a cera extraída da cana-de-açúcar, foram avaliadas algumas propriedades físico-químicas e térmicas da mesma, em termos da determinação do índice de acidez, saponificação, iodo, matéria insaponificável, teor de ácidos graxos livres, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, solubilidade por microscopia óptica, calorimetria exploratória diferencial, análise termogravimétrica e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

Algumas das características da cera obtida foram comparadas com amostras de ceras comerciais de carnaúba e candelila (adotadas como amostra de referência), fornecidas pela empresa Multiceras (Monterrey, México).

3.3.1 Índices Analíticos

3.3.1.1 Índice de Acidez e Ácidos Graxos Livres

O índice de acidez (IA) indica a quantidade de ácidos graxos livres presentes na amostra, a partir da quantidade de KOH necessária para neutralizar 1 g de cera (Parish e Grainger, 2017). Para a determinação destes índices normalmente é utilizado tolueno como solvente de diluição, uma vez que além de permitir uma boa solubilização da cera, o mesmo é miscível nas soluções alcalinas alcoólicas utilizadas (Warth, 1956; Parish e Grainger, 2017).

Para a determinação deste parâmetro e do teor de ácidos graxos livres (AGL) foi utilizado o método AOCS Ca 5a-40 (2004), adaptado segundo Rozário (2006) e Lopes (2010). Para tal, foi dissolvido 1 g de cera em 10 mL de tolueno à quente para a fusão da cera e, 100 mL de álcool etílico 95%. Na sequência foi realizada a titulação com solução padronizada de NaOH 0,05 N e fenolftaleína. O índice de acidez, expresso em mg de KOH necessários para neutralizar 1 g de cera, foi determinado a partir da Equação 3.

$$IA (mg KOH/g) = \frac{V \times N \times 56,10}{m} \quad (3)$$

onde, V é o volume de NaOH utilizado na titulação (mL); N é a normalidade da solução e; m a massa de cera (g).

O teor de ácidos graxos livres (AGL) (como ácido oleico) pode ser obtido a partir da Equação 4, ou correlacionado com o índice de acidez, a partir da divisão do índice de acidez pelo fator 1,99. Este cálculo se baseia na suposição de que a massa molecular do ácido graxo livre em maior proporção é igual ao do ácido oleico.

$$AGL (\% \text{ como ácido oléico}) = \frac{V \times N \times 28,2}{m} \times 100 \quad (4)$$

3.3.1.2 Índice de Saponificação

O índice de saponificação (IS) representa a quantidade de ácidos graxos livres e esterificados na amostra, expressos em número de miligramas de KOH necessário para saponificar (hidrolisar) 1 g de cera e está relacionado à massa molecular do lipídio (Parish e Grainger, 2017).

A determinação deste parâmetro foi realizada conforme método AOCS Cd 3-25, adaptado segundo Viera (2003) e Parish e Grainger (2017). Uma solução contendo 0,5 g de cera, 20 mL de tolueno e 10 mL de solução de KOH etanólica 0,5 M foi mantida sob refluxo por 4 h, resfriada, e na sequência submetida à titulação com solução padronizada de HCl 0,5 N e fenolftaleína. Um ensaio em branco (sem a amostra), também foi realizado nas mesmas condições. O índice de saponificação, expresso mg de KOH necessários para saponificar 1 g de cera, foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$IS (mg KOH/g) = \frac{(B-V) \times N \times 56,10}{m} \quad (5)$$

onde, B e V , são o volume gasto na titulação do branco e da amostra (mL), respectivamente; N , normalidade da solução e; m , a massa da amostra (g).

Como o IA é um indicativo da quantidade de ácidos graxos livres, e o IS da quantidade de ácidos graxos livres e esterificados, através da relação entre esses índices pode-se estimar a razão, em massa, entre ésteres e ácidos graxos livres (Hwang et al., 2002b; Lopes, 2010).

3.3.1.3 Índice de Iodo

O índice de iodo (II) é um parâmetro utilizado para obter a medida do grau de instauração presente em óleos e gorduras. Este fator expressa a quantidade de iodo que é absorvida pela cera (Parish e Grainger, 2017). Existem duas soluções titulantes principais para a determinação deste parâmetro, que são a solução de Wijs e de Hanus, onde 1 mL de reagente possuem 13,0 mg e 13,2 mg de iodo, respectivamente.

O índice de iodo foi determinado de acordo método AOCS Cd 1d-92, adaptado por Vieira (2003) e Rozário (2006), utilizando a solução de Wijs. Para tal, 0,5 g de cera foi dissolvida à quente em 7,5 mL de ciclo-hexano. Após total dissolução e resfriamento, foram adicionados 7,5 mL de ácido acético e 25 mL de solução de Wijs e, o recipiente foi mantido fechado na ausência de luz por 1 h. Após este período foram adicionados 20 mL de solução de KI 10%, 150 mL de água destilada e a amostra foi titulada com solução padronizada de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N, utilizando solução de amido 1% como indicador.

O branco foi preparado seguindo o mesmo procedimento, sem a amostra de cera. O índice de iodo, expresso em termos da quantidade (mg) de iodo absorvido por 100 mg de amostra, foi calculado conforme Equação 6.

$$II(\text{mgI}/100 \text{ mg}) = \frac{[(B-V) \times N \times 12,69]}{m} \quad (6)$$

onde B e V , são o volume (mL) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N gastos na titulação do branco e da amostra, respectivamente; N , normalidade da solução ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e; m , massa da amostra (g).

3.3.1.4 Índice de Matéria Insaponificável

O índice de matéria insaponificável (MI) representa o material solúvel em gorduras e que permanece insolúvel na fase aquosa após saponificação total da cera com o álcali. A matéria insaponificável é comumente formada por álcoois graxos e hidrocarbonetos, além de esteróis e vitaminas (Thomas, 2005).

Para a determinação deste parâmetro foi utilizado o método AOCS Ca 6b-53 (2001), adaptado segundo Rozário (2006) e Lopes (2010). Foram dissolvidos 0,5 g de amostra em 10 mL de tolueno sob aquecimento e, na sequência, foram adicionados 3 mL de solução de KOH 50% e 50 mL de álcool etílico 95%. A mistura foi mantida em refluxo por 4 h e, na sequência foi transferida para um funil de separação onde foram

adicionados 50 mL de éter de petróleo e 50 mL de solução salina 10%. Após agitação, a mistura foi mantida em repouso por 10 min e, a fase etérea separada. Após 5 extrações (com éter de petróleo e solução salina), as fases etéreas foram lavadas com solução salina (20mL, 3x), seguida de solução de KOH 0,5 M (20 mL, 3x), intercaladas com porções de água destilada. Após a terceira lavagem com KOH, a fração etérea foi lavada com água até teste negativo com fenolftaleína.

O material foi seco em estufa (Nova Ética, modelo 402-3N) a 105 °C até peso constante (A), o resíduo foi dissolvido em 2 mL de éter de petróleo e 10 mL de álcool etílico 95% e titulado 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 oleico. Foi feita uma amostra branco (C), utilizando o mesmo procedimento. O índice matéria insaponificável (MI) foi determinado a partir da Equação 7.

$$MI (\%) = \frac{A-(B+C)}{m} \times 100 \quad (7)$$

onde A, B e C são as massas dos resíduos, ácidos graxos e branco, respectivamente, e *m* é a massa da amostra (g).

3.3.2 Espectroscopia no FTIR

A técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para identificar os principais grupos funcionais das ceras à medida em que é capaz de fornecer informações dos constituintes das amostras de modo barato, simples, rápido e eficaz. Foram avaliados dois métodos de análise: modo de Refletância Total Atenuada (ATR) e Transmissão (pastilhas de KBr).

As análises foram conduzidas em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Thermo Scientific, Nicolet 6700). No modo ATR foi utilizado um cristal de Germânio e acessório SMART OMNI SAMPLER operando na faixa de 675 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 128 scan. Para a análise no modo de transmitância, transferiu-se uma pequena porção de amostra para o almofariz de ágata e adicionou-se KBr na proporção de cerca de 0,2/100 para preparação da pastilha prensada (~ 7 ton por 4 min). A medida foi feita utilizando o acessório SNAP-IN BASEPLATE, com faixa de 400 a 4000 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ e 128 scan.

Os espectros FTIR dos extratos de cera de cana-de-açúcar bruta e purificada foram comparados com os espectros das amostras de ceras comerciais de carnaúba e candelila (Multiceras Group, México).

3.3.3 Solubilidade por microscopia óptica (OM)

Para obter uma indicação de solubilidade da cera, a amostra foi dissolvida em diferentes solventes utilizando um agitador magnético a temperatura constante. Um suporte de disco de alumínio posicionado sobre uma placa de agitação controlada termicamente Pt1000 (série LBX Instruments H03D) foi usado para operar a 200 rpm e 30 °C. 10 mg de cera bruta foram dissolvidos em 1 mL de solvente, com novas alíquotas de 1 mL adicionadas a cada 12 h, até completar 72 h de solubilização. As amostras foram analisadas a partir de um microscópio óptico (Leica, DM2700 M, China) a 30 °C com ampliação de 100x. Para os solventes que proporcionaram um maior grau de dissolução, amostras de diferentes concentrações foram analisadas por OM a 40 e 50 °C.

A adequação do solvente para efetuar a dissolução da cera bruta pode ser avaliada por sua capacidade de dissolução da fração graxa (Azzam, 1986). Neste contexto, os solventes utilizados incluem álcoois (metanol, etanol e decanol), hidrocarboneto (hexano), apróticos dipolares (dimetilsulfóxido, acetonitrila), éster (acetato de etila), cetona (acetona), halogenado (clorofórmio), ácidos (ácido acético, ácido láctico, ácido octanóico), terpenos (limoneno, terebentina), entre outros (água, etanolamina-mono e éter etílico).

3.3.4 Propriedades térmicas

As análises termogravimétricas (TGA) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas com o objetivo de conhecer as temperaturas de fusão, cristalização e decomposição das amostras.

3.3.4.1 Calorimetria exploratória diferencial

A análise DSC foi realizada para se conhecer o comportamento térmico da cera, para isso foram determinadas as temperaturas de solidificação, fusão, assim como as entalpias de transição do material. As análises térmicas foram realizadas utilizando um calorímetro diferencial de varredura (DSC, Mettler Toledo, Suíça), calibrado para temperatura e fluxo de calor com metal índio (PF = 156,6 °C). Um fluxo

nitrogênio a $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foi purgado na célula. Aproximadamente $10 \mu\text{g}$ de amostra foi pesada (balança micro analítica, Mettler Toledo, MX5) em uma panelinha de alumínio de DSC hermeticamente vedada e colocada na célula de ensaio juntamente com uma panelinha de alumínio vazia, utilizada como referência.

Para determinação do perfil de solidificação e fusão das amostras, inicialmente foi adotada a metodologia proposta por Athukorala et al. (2009), Inarkar e Lele (2012) e Attard et al. (2015), identificado como “método 1”. Para tal, primeiramente as amostras foram aquecidas de 25 a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ (para fundir a amostra e apagar o histórico térmico da mesma) a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, com isoterma de 1 min , e então a resfriada a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ (a $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Após permanecer por 1 min a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$, o sistema foi aquecido até $105 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ para se determinar o ponto de fusão.

Foram realizadas algumas modificações no método 1, e as novas condições de análise foram identificadas como método 2, 3 e 4, e tiveram isotermas em todas as etapas alteradas para 20 min para garantir que a amostra alcançasse a sua forma mais estável. Além disto, nos métodos 2 e 3 foi realizado o resfriamento da amostra a 5 e $1 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente, para verificar como a solidificação muda de acordo com a taxa de resfriamento. A única alteração do método 4 em relação ao 1 foi o uso de isoterma de 20 min . As condições avaliadas estão sumarizadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Condições para análise de DSC

	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
1° Aquecimento ($^\circ\text{C}$)		25 a 105		
Taxa ($^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)		10		
Isoterma (min)	1	20	20	20
Resfriamento ($^\circ\text{C}$)		105 a -10		
Taxa ($^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	10	5	1	10
Isoterma (min)	1	20	20	20
2° Aquecimento ($^\circ\text{C}$)		-10 a 105		
Taxa ($^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)		10		

3.3.4.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica que consiste na determinação das temperaturas de decomposição das amostras a partir da variação da sua massa em função do tempo e temperatura. As análises foram realizadas em um equipamento TGA-50M (Shimadzu), além de uma balança micro analítica (Mettler Toledo, MX5). As análises foram conduzidas em um cadinho de porcelana sob atmosfera de ar sintético para reproduzir a composição do ar ambiente, com vazão de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, faixa de

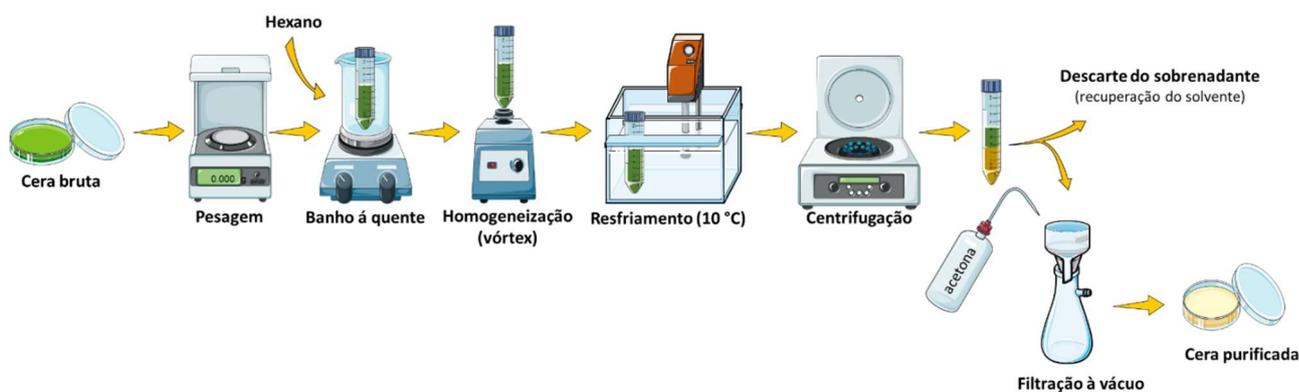
temperatura de 25 a 600 °C, e taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Foi utilizada massa de amostra aproximadamente de 5 mg.

3.4 PURIFICAÇÃO

Após as etapas de extração e caracterização, a cera bruta foi submetida à etapa de purificação para a remoção da cor escura, açúcares, além de resinas e algumas impurezas que podem conferir propriedades indesejadas à cera bruta.

Foi utilizado o procedimento proposto por Vieira (2003), que consistiu na homogeneização à quente da cera bruta em hexano (1:20, m/v), resfriamento a 10 °C (temperatura na qual permaneceu por 1 h), e posterior centrifugação (15 min a 4000 rpm) (centrífuga Kasvi, K14-4000). O precipitado foi lavado com acetona (1:2, m/v) a 10 °C, e a fração de cera precipitada foi separada por filtração a vácuo utilizando papéis de filtro quantitativos de faixa azul com abertura de 8 µm e, secas a temperatura ambiente. Um esquema ilustrativo do procedimento de purificação é representado na Figura 3.4.

Figura 3.4 - Procedimento de purificação da cera bruta



O rendimento de cera purificada (R_P) foi calculado a partir da massa de cera purificada (m_{CP}) obtida e massa de cera bruta (m_{CB}) utilizada para fazer a purificação, conforme Equação 8.

$$R_P(\%) = \frac{m_{CP}}{m_{CB}} \times 100 \quad (8)$$

A cera purificada foi caracterizada quanto ao seu índice de acidez, saponificação, iodo, matéria insaponificável, teor de ácidos graxos livres, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, calorimetria

exploratória diferencial e análise termogravimétrica, conforme procedimento apresentado anteriormente.

3.5 REAÇÕES DE CLIVAGEM DO ÉSTER

A fim de se conduzir as etapas subsequentes deste trabalho com um material mais enriquecido em álcoois graxos, foram avaliados seis métodos de clivagem da ligação éster (saponificação e transesterificação) descritos na literatura para verificar qual seria capaz de desempenhar uma maior conversão dos ésteres de cera em álcoois graxos.

A partir do levantamento realizado, verificou-se que o rendimento de policosanol observado em ceras varia muito de acordo com o método empregado, apresentando valores na faixa de 9,8 - 10,8% (Ishaka et al., 2014), 13,2 - 13,9% (Srisaipet et al., 2017), 14,6% (Srisaipet et al., 2016), 18,1 - 28,0% (Wang et al., 2007) e 2,0 - 47,0% (Ramos-Zambrano et al., 2019). Haja vista que os rendimentos alcançados por Wang et al. (2007) e Ramos-Zambrano et al. (2019) foram os maiores dentre os apresentados, os métodos propostos por estes autores foram avaliados. O método apresentado por Ramos-Zambrano et al. (2019) consistiu em uma saponificação de 1,0 g de cera e 100 mL de NaOH (20%, m/v) com agitação durante 4 h a 90 °C. A mistura foi resfriada, filtrada e, a torta residual foi extraída com clorofórmio via Soxhlet por 4 h. Por fim, o extrato foi resfriado, evaporado e seco.

Considerando o rendimento de policosanol e teor de octacosanol obtido, optou-se por utilizar o método denominado “A” por Wang et al. (2007), que consistiu na transesterificação. Para tal, 1,0 g de cera, 5 mL de etanol 95% e 0,1 g de NaOH foram submetidos a refluxo (a 70 °C por 4 h) com agitação contínua. 2 mL de solução alcoólica de CaCl₂ (2,4 g de CaCl₂ e 40 mL de etanol 95%) foram adicionados e a mistura foi filtrada ainda quente. Após duas lavagens com etanol 95%, a torta retida no filtro foi descartada. Os filtrados coletados foram combinados, resfriados e filtrados novamente. A torta obtida nesta etapa foi dissolvida em acetona a 50 °C e filtrada, sendo o produto obtido seco a temperatura ambiente.

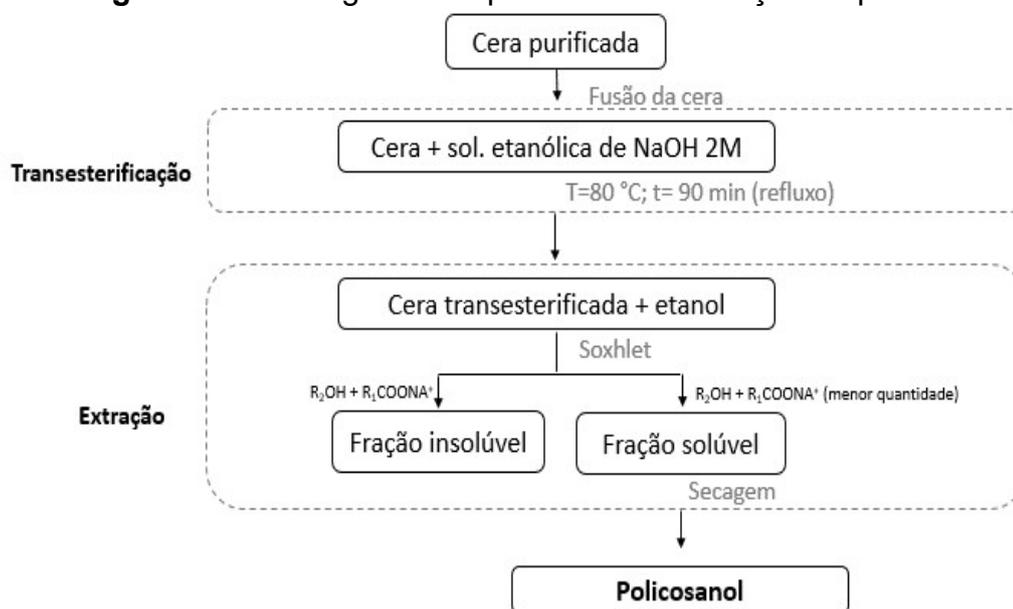
Foi avaliada também a metodologia proposta por Irmak e Dunford (2005) e Irmak et al. (2006), que é largamente empregada na literatura para a obtenção de policosanol a partir de diferentes fontes (Asikin et al., 2008; Chen et al., 2009; Ou et al., 2012; Má e al., 2018). O método consiste na transesterificação da 1,0 g amostra com 10 mL de NaOH 1,0 N em metanol, sob refluxo (a 75 °C por 45 min), seguido de

resfriamento e filtragem a vácuo. A torta residual foi transferida para um funil de separação juntamente com água destilada (20 mL) e extraída com hexano (20 mL, 4x). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com água até pH 7 e secas a temperatura ambiente.

Foi utilizado o método proposto por Liang et al. (2017), que consistiu na transesterificação de 5,0 g de amostra em 50 mL de KOH 10% em etanol, e refluxo com agitação a 70 °C por 4 h. Após reação, foram adicionados 50 mL de água e o etanol foi evaporado com auxílio de vácuo. Os lipídios insaponificáveis da fase aquosa foram extraídos com hexano (100 mL, 3x), seguido de clorofórmio (100 mL, 3x). As frações obtidas após extração com hexano e clorofórmio foram analisadas separadamente.

Também foi avaliada a metodologia otimizada por Wada (2008) e Lopes (2010), a partir de modificações realizadas na patente desenvolvida por Laguna Granja et al. (1997 e 1999), que consistiu na transesterificação seguida de extração, conforme apresentado na Figura 3.5.

Figura 3.5 - Fluxograma do processo de obtenção do policosanol



Fonte: Adaptado de Laguna Granja et al. (1997 e 1999), Wada (2008) e Lopes (2010).

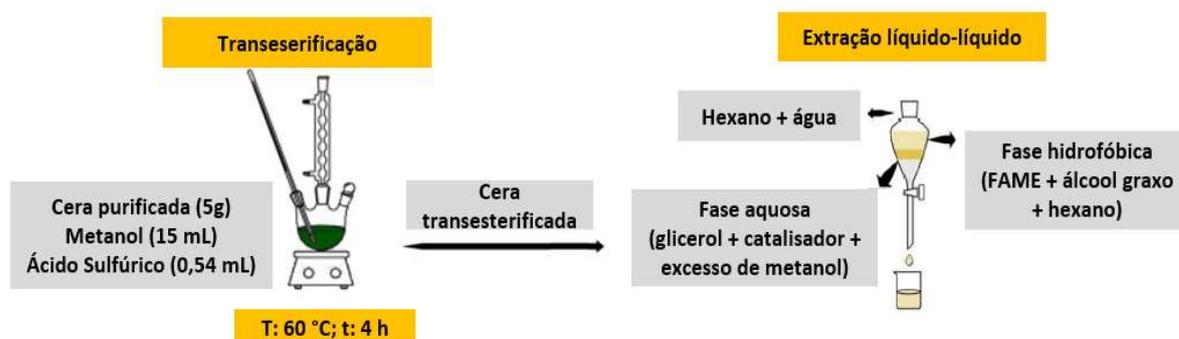
Após fusão, a cera foi submetida a refluxo (por 10 min a 80 °C) juntamente com solução hidro alcoólica (85% etanol anidro e 15% de água) de NaOH 2,0 M na proporção de cera:solução NaOH (1:1, m/v). A separação das frações dos álcoois e ácidos graxos (na forma de sabão) foi realizada a partir da extração do material com

etanol em Soxhlet, por três ciclos. Após a extração, a fração solúvel em etanol a quente e rica em álcoois graxos foi concentrada em um evaporado rotativo a vácuo.

Apesar de não haver precedente para a transesterificação por via ácida da cera de cana-de-açúcar para a obtenção do policosanol, foi realizada esta abordagem uma vez que se apresenta promissora já que a esterificação dos ácidos graxos livres ocorre simultaneamente com a transesterificação, evitando assim a formação de sabão.

Inicialmente pretendia-se utilizar o mesmo procedimento adotado por Oliveira (2011) que avaliou a viabilidade em transformar o óleo de cera de cana-de-açúcar em ésteres etílicos através de uma catálise ácida. O autor utilizou álcool etílico anidro em excesso, ácido sulfúrico concentrado como catalisador e aquecimento, com reação realizada em tubo hermeticamente fechado, conforme metodologia utilizada por Marchetti e Errazu (2008) para a análise do óleo de girassol. Entretanto, a fim de realizar uma transesterificação de forma mais simples e segura, optou-se por adotar o procedimento descrito por Ehimen et al. (2010) e Jesus et al. (2019) para a análise de lipídios da microalga *Chlorella*, que consistiu em uma transesterificação seguida de extração líquido-líquido, conforme ilustrado na Figura 3.6.

Figura 3.6 - Representação esquemática das etapas de transesterificação ácida em metanol



Fonte: Adaptado de Ehimen et al. (2010) e Jesus et al. (2019).

Embora Jesus et al. (2019) tenha realizado a reação a 90 °C, o estudo realizado por Ehimen et al. (2010) observou a não ocorrência de alterações significativas na conversão de ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos ao elevar a temperatura de 60 °C para 90 °C e, para fins práticos e de segurança, optou-se por conduzir estes ensaios a 60 °C. Vale salientar que nenhum destes autores avaliaram a presença e o teor de álcoois graxos nas amostras.

3.6 ENSAIOS DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

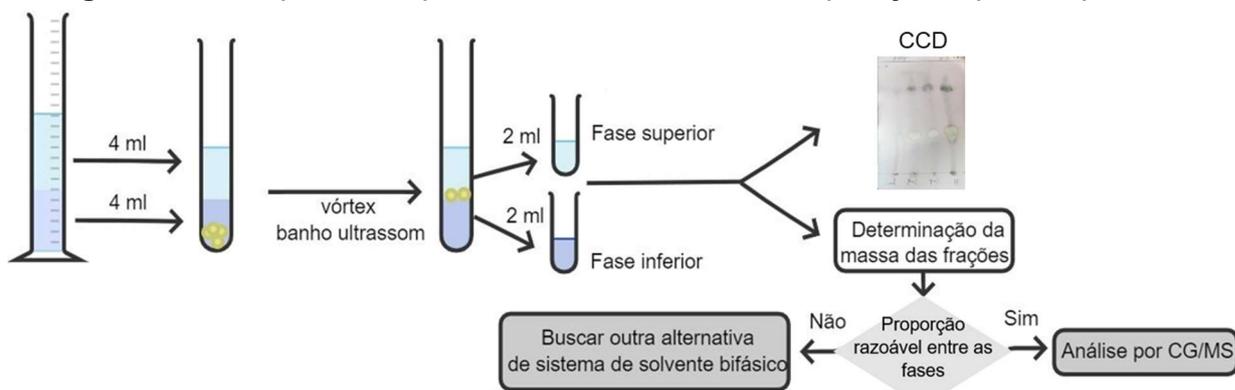
No intuito de utilizar a técnica de cromatografia contracorrente para a obtenção de frações concentradas de álcoois graxos a partir de cera purificada, foram realizados ensaios preliminares de partição líquido-líquido com sistemas de solventes bifásicos de diferentes polaridades. A etapa de seleção do sistema de solventes é fundamental para eleger os solventes que compõem a fase móvel e a fase estacionária (Ito e Conway, 1996, Liu et al., 2015), levando em consideração a natureza e a proporção de cada solvente para obter um equilíbrio termodinâmico (Friesen e Pauli, 2005).

Este trabalho foi desenvolvido a partir do uso da família de solventes formada por hexano/acetato de etila/metanol/água (HEMWat) e as variações dos solventes desta família, já que o metanol pode ser substituído por etanol, propanol ou butanol; acetato de etila substituído por clorofórmio ou diclorometano, entre outros (Costa e Leitão, 2010).

Para os testes de partição líquido-líquido, em um tubo de ensaio com rosca foram adicionados $0,0400 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$ de cera purificada e uma mesma proporção de fase superior e fase inferior (4 mL/4 mL) do sistema de solvente avaliado. A mistura foi sonificada em banho ultrassom e agitada em vórtex (1 min).

Alíquotas com volumes iguais de ambas as fases foram coletadas para a avaliação da partição dos componentes da cera. O perfil químico das fases superior e inferior de todos os sistemas analisados foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) e os sistemas que possibilitaram obter massa de amostra equiparáveis em cada fase, foram analisados por CG-EM. Um esquema resumido do procedimento adotado para a condução dos testes de partição está representado pela Figura 3.7.

Figura 3.7 - Esquema do procedimento dos testes de partição líquido-líquido



3.7 TÉCNICAS DE FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA E COMPLEXAÇÃO COM UREIA

A purificação do policosanol (octacosanol) contido na cera foi avaliada também a partir do emprego da cromatografia em coluna (seca e *flash*), que é uma técnica frequentemente utilizada para o isolamento e purificação de diferentes produtos naturais. A partir do conhecimento de que a cera é composta majoritariamente por ácidos graxos, além de álcoois graxos e ésteres, buscou-se na literatura por alternativas capazes de remover estes ácidos de modo que os mesmos não interferissem na obtenção dos álcoois graxos. Nestes sentido, foi avaliada a complexação dos ácidos graxos por ureia visando removê-los da cera. Diante disto, este tópico abordará inicialmente o método empregado na complexação com ureia e posteriormente as técnicas de cromatografia em coluna (seca e *flash*) com sílica gel.

A metodologia de separação cromatográfica dos constituintes da cera foi desenvolvida na Divisão de Química de Produtos Naturais (DQPN) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

3.7.1 Complexação com ureia

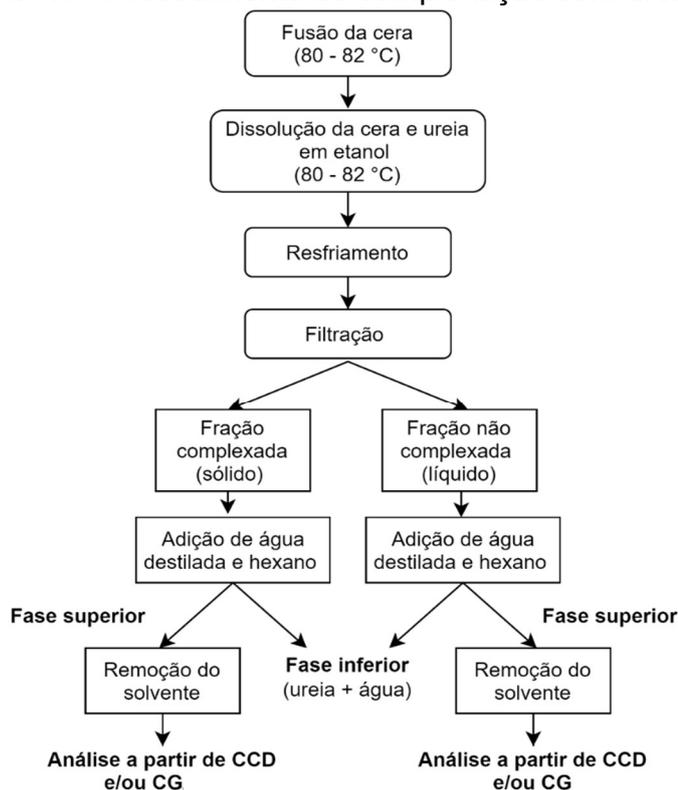
O método de complexação com ureia ou método da inclusão, baseia-se na separação dos ácidos graxos de acordo com o seu grau de insaturação, de modo que os ácidos mais insaturados são menos complexados com a ureia (González-Fernández et al., 2020). A complexação com ureia é um método clássico de separação de ácidos graxos a partir de óleos e gorduras (Hayes et al., 1998) e, neste trabalho foi adaptado para a remoção dos ácidos graxos presentes na cera da cana-de-açúcar. Ainda que antigo, este método responde bem aos desafios modernos à medida em que é simples, rápido, eficiente, barato e ambientalmente amigável (Schlenk e Holman, 1950; Hayes et al., 1998; González-Fernández et al., 2020).

Neste estudo a complexação com ureia foi conduzida a partir de adaptações dos métodos propostos por Schröder e Vetter (2013) e Ratnayake et al. (1988), utilizando duas proporções de cera purificada:ureia:etanol (1:6:20 e 1:3:40, m/m/v). O procedimento de complexação de ureia utilizado é resumido na Figura 3.8.

Para a realização do ensaio seguindo a primeira razão apresentada, 5,00 g \pm 0,01 g de cera foi fundida em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de bola com agitação magnética, na sequência foram adicionados 30,00 g \pm 0,01 g de ureia e 100 mL de etanol (95%). A mistura foi aquecida a 80 °C, com agitação

magnética, até formar uma solução homogênea e límpida, sendo na sequência mantida a temperatura ambiente por 20 h para promover o seu resfriamento lento até o aparecimento dos primeiros cristais e, posteriormente resfriada a 5 °C por 24 h. Os cristais formados (complexo de ácido graxo) foram separados da fração líquida rica em componentes não complexados a partir de filtração a vácuo em funil de Büchner.

Figura 3.8 - Procedimento de complexação com ureia



Para obtenção dos ácidos graxos deve-se realizar a diluição da fração líquida rica em componentes não complexados em água destilada e acidificar a pH 4-5 com HCl 6 N, para que os ácidos graxos livres possam ser liberados e posteriormente extraídos com hexano. De maneira semelhante, os ácidos graxos da fração complexada podem ser recuperados após adição de água e acidificação com HCl (Ratnayake, et al., 1988; Wanasundara e Shahidi, 1999). Como o objetivo desta etapa era o de remover os ácidos graxos, as etapas de acidificação não foram conduzidas.

Ambas as frações (complexadas e não) foram lavadas com água e hexano para remover todos os vestígios do filtrado. Os extratos obtidos a partir da extração com hexano foram combinados e concentrados a securo em um evaporador rotativo a vácuo, e o rendimento destas frações foi determinado por gravimetria. O perfil químico

dos constituintes destas frações foi analisado por CCD e a quantificação do octacosanol foi realizada por CG-EM.

3.7.2 Cromatografia em coluna

Foram avaliadas duas técnicas visando a separação dos constituintes da cera purificada de cana-de-açúcar por coluna cromatográfica em sílica gel: a cromatografia em coluna seca e a cromatografia *flash*.

3.7.2.1 Cromatografia em coluna seca

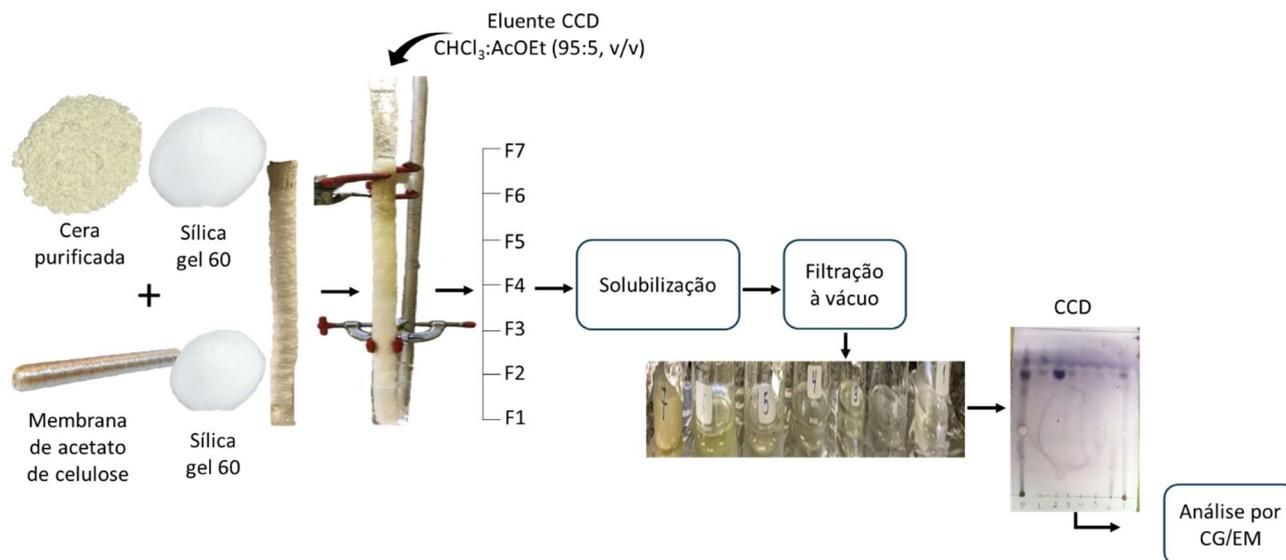
Na tentativa de se obter frações enriquecidas de octacosanol foi conduzido o ensaio de fracionamento da cera purificada por cromatografia em coluna seca. Para tal, foi utilizada membrana de acetato de celulose como coluna (2,2 cm de diâmetro), empacotada com sílica gel 60 (63 - 0,200 μm , Merck).

Na montagem da coluna foi utilizada uma coluna de membrana de acetato de celulose de 60 cm, que teve uma das extremidades fechada para a inserção de 26 g \pm 0,01 g de sílica gel. A coluna foi inicialmente lavada com hexano para remoção de graxas e após secagem, foi compactada a partir de compressões descendentes de porções da sílica a partir de sua extremidade aberta. Após compactada a coluna apresentou altura de 38,5 cm.

A amostra de cera foi previamente impregnada em sílica gel visando obter uma boa homogeneidade e distribuição do material a ser eluído. Para tal, foi realizada a solubilização de aproximadamente 1,0 g de cera purificada e 1,5 g de sílica em 80 mL de clorofórmio:acetato de etila (95:5, v/v) por 1 h a 80 °C, sob refluxo. Após completa solubilização, a amostra foi concentrada em evaporador rotativo a vácuo até completa secura, então foi depositada no topo da coluna e eluída com o mesmo eluente empregado na análise por CCD, clorofórmio:acetato de etila (95:5, v/v). O procedimento de fracionamento da cera purificada a partir da cromatografia em coluna seca está representado pela Figura 3.9.

Após a eluição, a coluna foi fragmentada em 7 frações e cada fração foi então extraída em clorofórmio:acetato de etila (95:5, v/v) por 5 min com agitação magnética e, filtrada a vácuo para a remoção da sílica. O rendimento de cada fração foi determinado por gravimetria e, as mesmas foram posteriormente analisadas por CCD. As frações que indicaram a presença de álcoois graxos foram posteriormente sililadas e analisadas por CG-EM.

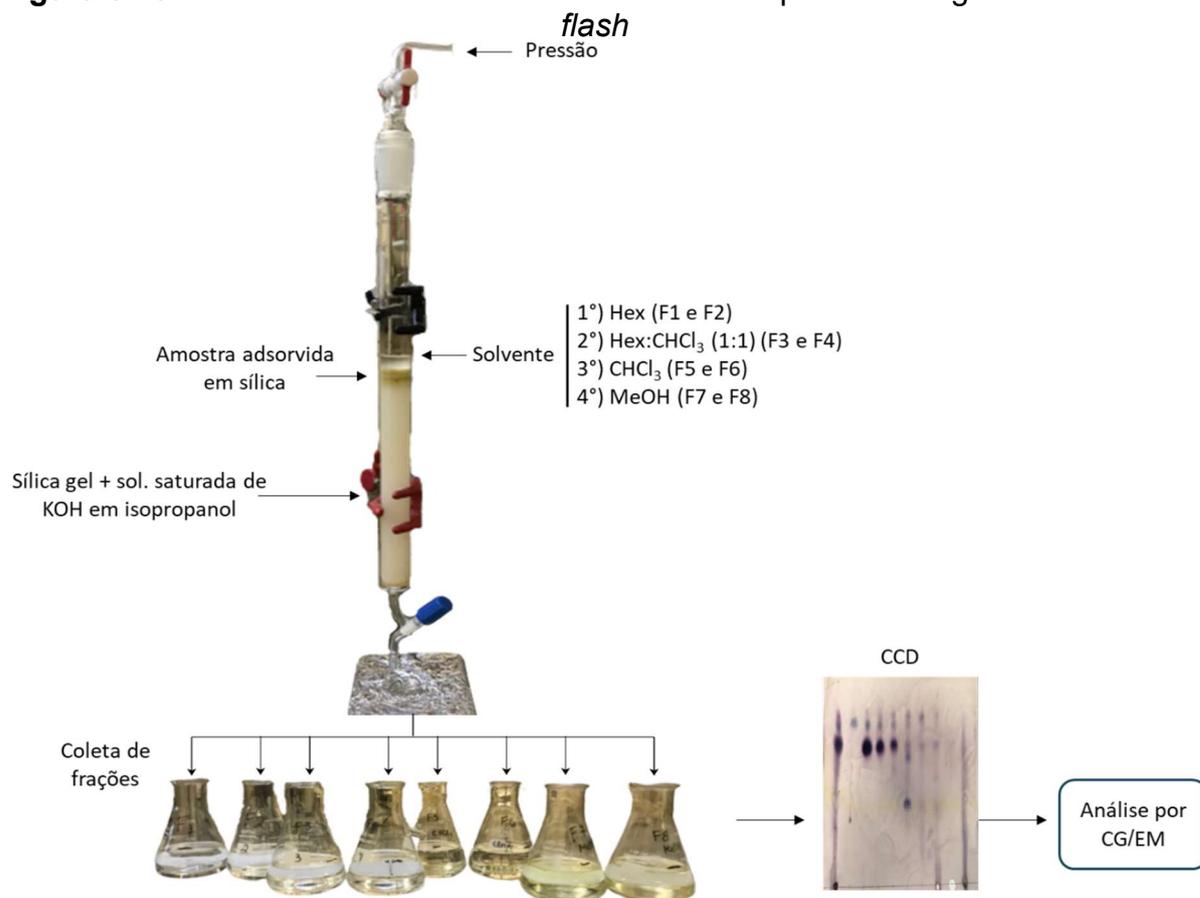
Figura 3.9 - Procedimento de fracionamento da cera por cromatografia em coluna seca



3.7.2.2 Cromatografia em coluna *flash*

A metodologia de fracionamento por coluna de sílica *flash* impregnada com KOH foi baseada na metodologia proposta por Pinto et al. (2000), feitas algumas modificações. Na metodologia adotada, 30 g \pm 0,01 g de sílica gel 60 "*flash*" (40 - 63 μ m, Merck) foi incorporada em 60 mL de solução saturada de KOH em isopropanol (50 g \pm 0,01 g KOH para 1 L de isopropanol). Essa mistura foi agitada por 10 min, transferida para uma coluna de vidro aberta (30 cm de comprimento e 2,2 cm de diâmetro) e lavada com 80 mL de hexano (2x), sob pressão de ar, para remover o isopropanol e excesso de KOH. O procedimento de fracionamento adotado está apresentado na Figura 3.10.

Para inserir a amostra na coluna foi necessário fazer a adsorção da mesma em sílica. Deste modo, 1,0 g de cera e 1,5 g de sílica gel 60 (63- 200 μ m) foram aquecidos, sob refluxo, em 80 mL de hexano a 80 °C. Após completa solubilização, a amostra foi concentrada em um evaporador rotativo a vácuo até completa secura. A amostra foi adicionada no topo da coluna e eluída sucessivamente sob pressão de ar comprimido a uma vazão de 1 mL.seg⁻¹ com quatro eluentes distintos na ordem crescente de polaridade: hexano (80 mL, 2x, fração F1 e F2), hexano:clorofórmio (1:1, v/v, 80 mL, 2x, fração F3 e F4), clorofórmio (80 mL, 2x, fração F5 e F6) e metanol (80 mL, 2x, fração F7 e F8).

Figura 3.10 - Procedimento de fracionamento da cera por cromatografia em coluna

3.8 IDENTIFICAÇÃO DO OCTACOSANOL

As metodologias de identificação dos álcoois graxos por CCD e análise por CG-EM foram desenvolvidas na Divisão de Química de Produtos Naturais (DQPN) e na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF), respectivamente, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

3.8.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As frações coletadas durante os experimentos foram monitoradas por CCD e as frações que indicaram uma maior concentração de álcoois graxos foram posteriormente sililadas e analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Para a realização das análises de CCD, foram utilizadas placas de alumínio pré-revestidas com sílica gel (60, F₂₅₄) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram aplicadas usando tubos capilares de vidro, e as placas foram eluídas com o sistema de solvente clorofórmio:acetato de etila (95:5, v/v). As placas desenvolvidas foram visualizadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm) e, os

compostos foram revelados por pulverização com revelador anisaldeído (ácido acético glacial, ácido sulfúrico concentrado e anisaldeído; 50:1:0,5, v/v/v), seguido de aquecimento a 105 °C (Wagner e Blatt, 1996). O método de pulverização com anisaldeído foi preferível frente ao de vaporização por iodo, uma vez que este último não é adequado para a identificação de ceras, já que as mesmas possuem poucas ligações duplas (Hwang et al., 2002b).

Para identificar corretamente as bandas de álcoois graxos, foi utilizada a mistura comercial de álcoois graxos (C₂₄-C₃₄) (Lesstanol® - Garuda International, Inc. Exeter, CA, EUA). O fator de retenção (R_f) de cada composto separado foi calculado a partir da Equação 9, e comparado com os valores das amostras de referência.

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pelo soluto}}{\text{distância percorrida pelo solvente}} \quad (9)$$

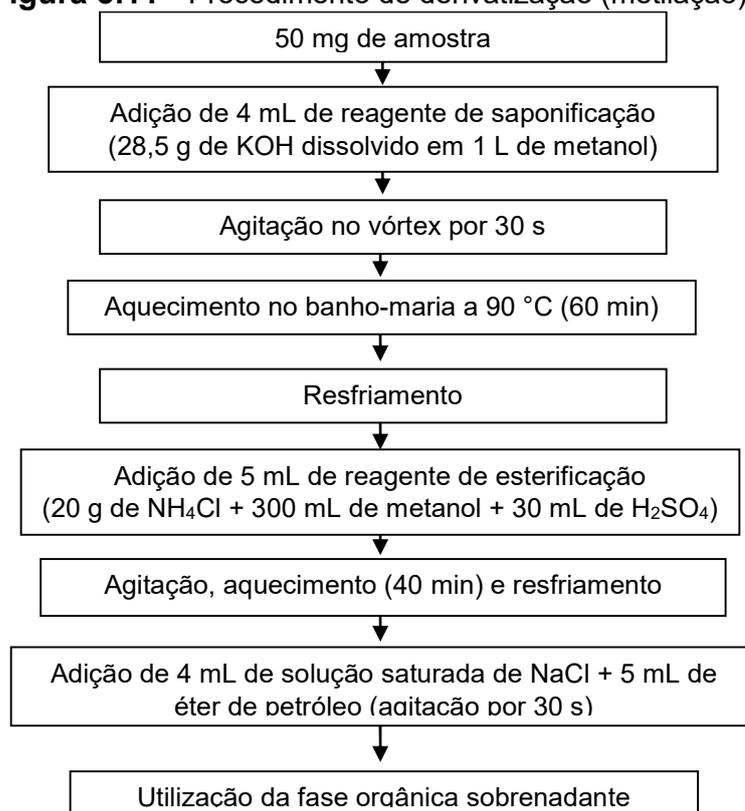
3.8.2 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas

Para a identificação dos álcoois graxos e quantificação do octacosanol, foi utilizada a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), uma vez que esta técnica tem sido amplamente utilizada para identificar álcoois, ácidos graxos, ésteres, além de outros constituintes encontrados em ceras naturais.

3.8.2.1 Derivatização

Foram avaliados dois métodos de derivatização para análise do material de estudo: a alquilação (metilação), onde os ácidos graxos são convertidos em seus respectivos ésteres metílicos e; a sililação, que consiste na substituição do hidrogênio ativo da hidroxila (-OH) por um substituinte mais apolar e volátil.

A metilação foi realizada conforme método oficial AOCS Ce 2-66 e procedimento proposto por Hartman e Lago (1973) (com modificações no tempo de saponificação e esterificação), que consiste nas etapas de saponificação, seguida por esterificação e adição de solução de cloreto de sódio saturado e éter de petróleo, conforme apresentado na Figura 3.11.

Figura 3.11 - Procedimento de derivatização (metilação)

Optou-se também por fazer a derivatização por meio da sililação, que consiste na substituição nucleofílica do hidrogênio ativo do grupo -OH por um grupo trimetilsilil [-Si(CH₃)₃], que são derivados mais voláteis e estáveis, possibilitando a geração de picos mais estreitos e simétricos. As amostras (10 mg) foram solubilizadas em 5 mL da mistura de hexano:clorofórmio (1:1, v/v) e sililadas com 200 µL de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), a 50 °C durante 30 min.

3.8.2.2 Condições da CG-EM

3.8.2.2.1 Identificação dos constituintes

Para a realização dos ensaios foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA - EUA), equipado com um espectrômetro de massas modelo 5975 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA - EUA) e coluna capilar de sílica fundida (HP-5MS: 5% de fenil - 95% de dimetilpolisiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. Foram injetadas alíquotas de 2 µL, com modo *split* (50:1) e utilizando hélio como gás de arraste com vazão de 1,0 mL.min⁻¹. O injetor e o detector (EM) foram mantidos a 320 °C, enquanto inicialmente a coluna foi mantida a 180 °C, por 5 min, seguido de aquecimento de 180 a 300°C (a 4 °C.min⁻¹), permanecendo a 300 °C por 25 min,

totalizando assim 60 min de corrida. O espectrômetro de massas (EM) operou a 70 eV, com temperatura do quadruplo e da fonte mantidas a 230 °C e 150 °C, respectivamente, e com intervalo de varredura de aquisição de massas na faixa de 30-600 u.m.a. (unidade de massa atômica).

A identificação dos picos foi realizada a partir da comparação direta entre os espectros de massas dos componentes das amostras com os espectros de massas obtidos a partir do banco de dados da biblioteca NIST-11 (*National Institute of Standards and Technology*). A quantificação de octacosanol foi realizada com base na curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de padrões de octacosanol (C₂₈) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO - EUA).

3.8.2.2.2 Curva de calibração

O cálculo das concentrações de octacosanol foi determinado por calibração externa. Inicialmente foi realizada a sililação do padrão de octacosanol (30 mg), juntamente com 4 mL de hexano:clorofórmio (1:1, v/v) e 300 µL do agente sililante N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), com agitação a 50 °C por 30 min.

O octacosanol sililado foi transferido para um balão de 25 mL avolumado com hexano:clorofórmio (1:1, v/v), para formar a solução estoque do padrão de octacosanol. A curva de calibração foi preparada por meio da diluição da solução estoque, com a transferência de alíquotas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL e 7 mL para balões volumétricos de 10 mL, e estes foram avolumados com hexano:clorofórmio (1:1, v/v).

A função da concentração *versus* intensidade do pico da curva de calibração do octacosanol sililado foi correlacionado com os diferentes níveis de concentração de octacosanol sililado nas amostras. O teor de octacosanol foi expresso como mg.g⁻¹ de amostra ou mg.100g⁻¹ de casca da cana-de-açúcar. Para cada lote de amostra injetada foi feita uma nova curva de calibração do analito, sendo observados valores de coeficientes de correlação (r^2) das áreas de pico em comparação com a concentração do padrão de octacosanol superiores a 0,993, conforme apresentado no Apêndice A (Tabela A1 e Figura A1).

Capítulo 4

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos, conforme as etapas descritas no capítulo 3, os rendimentos obtidos a partir da extração e purificação da cera, além da caracterização destas amostras.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A casca obtida a partir da raspagem da cana-de-açúcar destinada à moagem para obtenção da garapa, foi caracterizada em relação à sua distribuição granulométrica, umidade e teor de lipídios totais.

Embora não tenha sido realizada, a extração de cera a partir da torta do filtro rotativo apresenta um grande potencial industrial, uma vez que este resíduo é obtido a partir da produção do álcool e açúcar, sendo gerado em maiores volumes quando comparado à casca e; durante o processamento da cana-de-açúcar, cerca de 40% da cera em pó presente na superfície da casca é misturada ao caldo e retida na torta do filtro rotativo concentrada com 95% dos lipídios (Laguna-Granja et al., 1997; Qi et al., 2017).

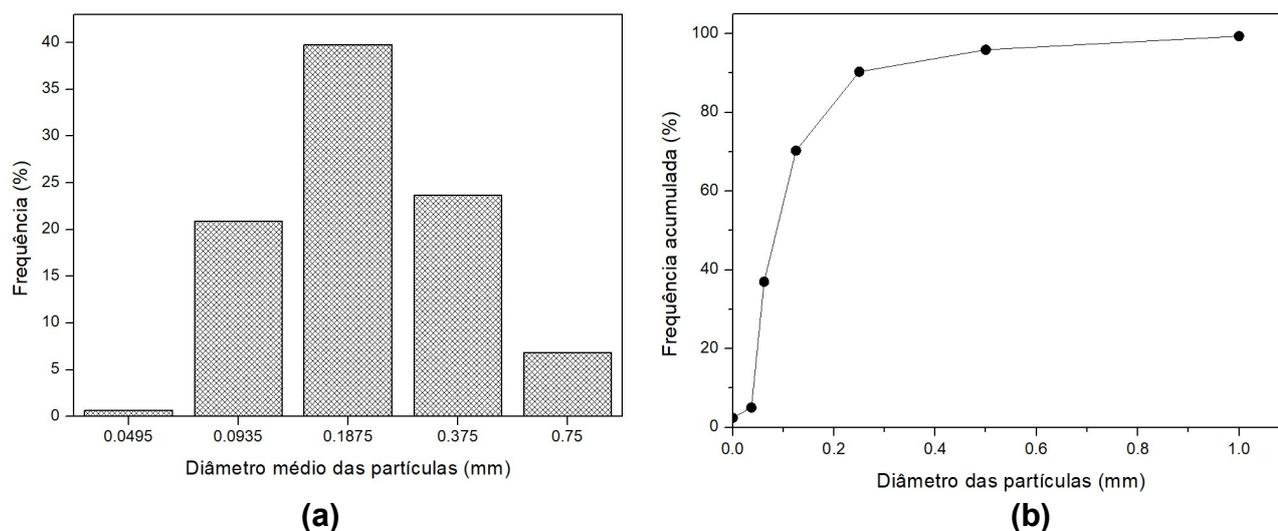
4.1.1 Distribuição granulométrica

O comportamento da distribuição granulométrica das partículas da casca da cana-de-açúcar em relação ao diâmetro médio das mesmas está apresentado na Figura 4.1(a). O histograma obtido apresentou comportamento unimodal (aproximadamente gaussiano), com maior frequência de partículas ocorrendo no diâmetro médio (d_m) de 0,1875 mm, o que representa aproximadamente 40% da frequência das partículas. Os d_m de 0,3750 e 0,9935 mm, apresentaram uma diferença da frequência de ocorrência das partículas inferior a 3%. A partir da análise da Figura 4.1(b) foi constatado os valores de 0,04, 0,08 e 0,21 mm para os parâmetros d_{10} , d_{50} e d_{90} , respectivamente.

Conforme observado por Henriques et al. (2018), a distribuição do tamanho de partículas interfere diretamente no rendimento de cera bruta a partir da casca da cana-de-açúcar. Foi observado que partículas menores favorecem a obtenção de maiores rendimentos de cera bruta, entretanto após processo de purificação, foi constatado que estas partículas com menores dimensões favorecem também a extração de

outros componentes que não compõem às ceras. Logo, como era de interesse a obtenção de cera purificada em maiores quantidades, não foram adicionadas etapas de cominuição de partículas, que poderiam acrescentar um aumento considerável de tempo e energia no processo. Desta forma, a matéria-prima foi utilizada conforme fornecida pelo produtor rural.

Figura 4.1 - (a) Distribuição do tamanho médio e, (b) frequência acumulada das partículas passantes da casca da cana-de-açúcar



4.1.2 Teor de umidade e lipídios totais

Dada a característica polar da água, a sua presença na matriz pode prejudicar ou mesmo impossibilitar o processo de extração da cera, já que os principais constituintes da cera e também o solvente empregado no processo de extração (hexano) apresentam característica apolar. Recomenda-se trabalhar com materiais apresentando teor máximo de 9 a 11% de umidade (Akoh e Min, 2002; Sluiter et al., 2005). Como o hexano e água são praticamente imiscíveis, um maior teor de umidade interfere na penetração do hexano no substrato e, conseqüentemente, afeta a taxa de extração (Akoh e Min, 2002). Neste contexto, foi observado que a casca da cana-de-açúcar utilizada apresentou teor de umidade de $9,77 \pm 0,28\%$, estando de acordo com o limite indicado por Akoh e Min (2002) e Oliveira (2018).

A casca da cana-de-açúcar avaliada (safra 2018/2019) apresentou teor de lipídios totais de $6,20 \pm 0,07\%$. Oliveira (2018) e Henriques (2018) utilizaram matéria-prima de mesma origem, diferindo apenas na safra (2015), e observaram teor total de lipídios próximo a 7,73%, evidenciando que diferentes condições de cultivo e extração

pode resultar em um material com características distintas. A safra de 2014/2015 foi grandemente impactada por condições adversas de chuvas abaixo da média e altas temperaturas, o que promoveu uma redução da produtividade dos canaviais e, conseqüentemente na qualidade da cana obtida (CONAB, 2017a e 2017b), o que pode ter contribuído com a observância de materiais com características distintas.

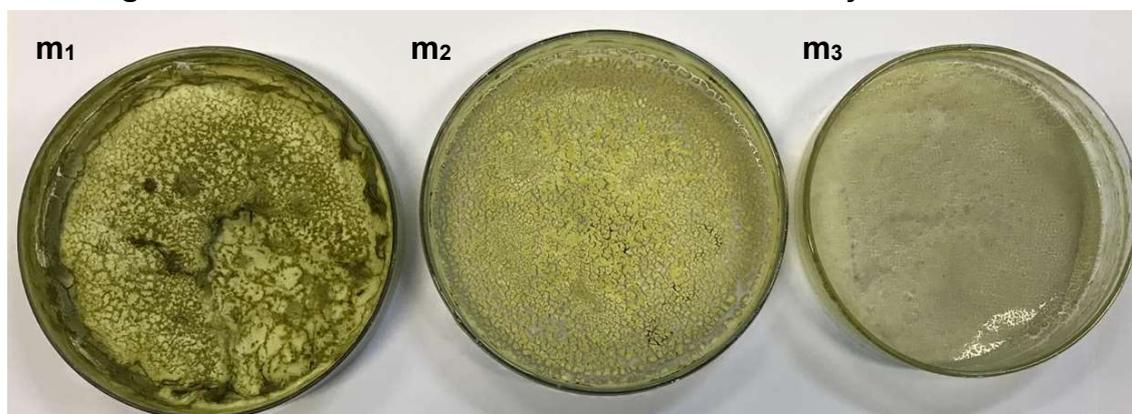
4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA CERA

4.2.1 Extração exaustiva

Inicialmente foi realizada a extração de $100 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de casca (Figura 3.1), a partir de 800 mL de hexano por 2 h e com uma potência que possibilitasse a contagem de 100 gotas.min⁻¹. Nestas condições foi encontrado um rendimento de cera bruta igual a $3,59 \pm 0,30\%$, o que foi muito aquém do esperado. Como a partir de uma matéria-prima de mesma origem foi possível extrair maiores quantidades de cera (7,22 - 8,34%) (Oliveira, 2018), optou-se pela realização da extração exaustiva, uma vez que esta técnica indica uma melhor condição na qual uma porção mais significativa de cera bruta pode ser extraída.

A extração exaustiva consiste na realização de três extrações consecutivas da mesma matriz e, para fins ilustrativos, os extratos obtidos a partir da primeira condição de extração exaustiva analisada (100 g, 800 mL, 2 h e 100 gotas.min⁻¹) são apresentados na Figura 4.2, na qual se nota que uma única etapa não foi suficiente para realizar o esgotamento da matriz.

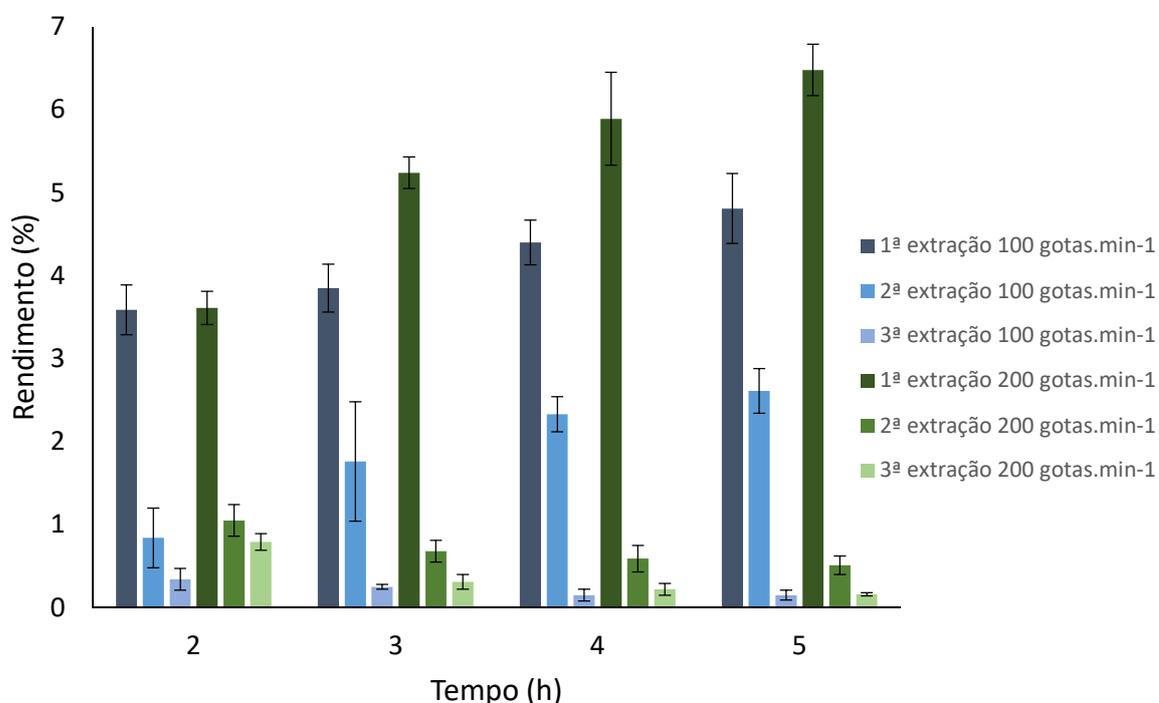
Figura 4.2 - Massa dos extratos resultantes da extração exaustiva



Legenda: Condição de extração: 100 g, 800 mL, 2 h e 100 gotas.min⁻¹; onde m₁, m₂ e m₃ correspondem às massas de $2,32 \pm 0,23 \text{ g}$, $0,38 \pm 0,12 \text{ g}$ e $0,24 \pm 0,08 \text{ g}$, respectivamente.

Após analisar os resultados deste primeiro ensaio de extração exaustiva, foi investigado se o aumento de fluxo de solvente para 200 gotas.min⁻¹ e do tempo de extração favoreceria o processo de extração. Na Figura 4.3 são apresentados os rendimentos bruto (r_1 , r_2 e r_3) para as diferentes condições avaliadas. São apresentados também o desvio padrão obtido a partir da média de três replicatas. As amostras referentes à extração com gotejamento de 100 gotas.min⁻¹ e 200 gotas.min⁻¹, são apresentadas em tons variantes da cor azul e verde, respectivamente.

Figura 4.3 - Rendimento bruto (r) da extração exaustiva da cera em função do tempo e da vazão de solvente



Legenda: r_1 (■), r_2 (■) e r_3 (■), para a condição de 100 gotas.min⁻¹ e; r_1 (■), r_2 (■) e r_3 (■), para a condição de 200 gotas.min⁻¹.

Observou-se o aumento do rendimento de extração (r) tanto com o tempo de extração quanto a vazão de solvente/gotejamento. A utilização de um maior gotejamento propicia uma maior circulação de solvente e, por seqüência, um maior esgotamento da matriz; podendo ser observado um r_1 bem mais expressivo na condição de 200 gotas.min⁻¹.

Oliveira (2018) obteve rendimentos de cera bruta variando de 7,26 a 8,34% ao realizar extrações com hexano durante 0,5 h, 1 h, 2 h e 4 h, alcançando resultados muito próximos ao de teor de lipídios totais (7,85%). O autor observou que nas

condições estudadas, o aumento de rendimento causado pelo prolongamento do tempo de extração (cerca de 1%), não justificava o emprego de maiores tempos de extração e, conseqüentemente, o gasto energético necessário para manter tais extrações.

Uma vez que a melhor condição de extração (5 h a 200 gotas.min⁻¹), com r_1 igual a $6,48 \pm 0,31\%$ e soma dos três extratos nesta condição ($r_1 + r_2 + r_3$) de 7,15%, tenha possibilitado rendimento superior ao teor total de lipídios ($6,20 \pm 0,07\%$), optou-se por não adicionar mais tempo de extração e, conseqüentemente, gastos energéticos associados, uma vez que se tratava de um processo em maior escala. A partir da determinação da melhor condição, todas as demais extrações foram realizadas durante 5 h e 200 gotas.min⁻¹, com rendimento médio de $6,48 \pm 0,31\%$. O material obtido a partir desta extração está apresentado na Figura 4.4.

Figura 4.4 - Cera bruta da cana-de-açúcar



O resíduo obtido após a extração da cera da casca da cana-de-açúcar apresenta um grande potencial de empregabilidade como adubo orgânico em campos de cultivo, uma vez que após a extração lipídica, os macro e micronutrientes presentes na matriz se tornam mais disponíveis no solo na ausência de lipídios (Gonçalves, 1998; Bhosale et al., 2012).

4.2.2 Purificação

Enquanto a cera bruta apresentou coloração verde, a cera purificada a partir da cristalização com acetona e hexano apresentou coloração ligeiramente esverdeada e com aspecto esbranquiçado, conforme Figura 4.5. Foi obtido rendimento de $60,98 \pm 0,98\%$ de cera purificada (com base na quantidade de cera bruta utilizada).

Figura 4.5 - Cera purificada da cana-de-açúcar

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA CERAS BRUTA E PURIFICADA

Como a composição da cana-de-açúcar depende de muitos fatores, como variedade da planta, condições de cultivo, método de extração ou tipo de solvente empregado, consequentemente a cera produzida a partir da mesma pode apresentar propriedades físico-químicas muito distintas. Logo, a caracterização da cera com relação aos índices analíticos (índice de acidez, saponificação, iodo e de matéria insaponificável), teor de ácidos graxos livres (AGL), espectro de absorção no infravermelho, solubilidade e propriedades térmicas (análise granulométrica e calorimetria exploratória diferencial), é de suma importância para se conhecer o material com o qual está se trabalhando.

4.3.1 Índices analíticos

Os índices analíticos da cera bruta da cana-de-açúcar obtidos neste trabalho e por diferentes autores estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Índices analíticos da cera bruta da cana-de-açúcar

Referência	Parâmetros			
	IA (mg KOH.g ⁻¹)	IS (mg KOH.g ⁻¹)	II - Wijs (mg I.100 g ⁻¹)	MI (%)
Este trabalho	33,4 ± 0,9	118,4 ± 3,3	29,0 ± 1,0	29,4 ± 2,8
Garcia e Garcia (1996)	32,0	98,0	28,0	-
Vieira (2003)	52,4 ± 1,6	123,5 ± 3,6	22,9 ± 2,3	35,5 ± 1,6
Gandra (2006)	36,2 ± 1,3	116,4 ± 1,6	48,1 ± 0,5	-
Rozário (2006)	27,3 ± 1,0	105,2 ± 3,0	33,3 ± 0,6	32,4 ± 2,2
Bhosale et al. (2012)	5,0 - 5,9	202,6 - 263,8	22,6 - 29,3	-

Nota: IA: Índice de Acidez; IS: Índice de Saponificação; II Índice de Iodo. MI: Índice de Matéria Insaponificável.

O valor de índice de acidez obtido foi inferior aos observados por Vieira (2003) e Gandra (2006) e, superior aos encontrados pelos demais autores. A cera bruta apresentou teor de ácidos graxos livres de $16,8 \pm 0,5\%$.

Pérez et al. (1993) observaram valores de IA muito superiores aos relatados na Tabela 4.1, na faixa de 448,8 a 732,1 mg.g^{-1} . Os autores associaram os altos valores à presença de uma fração resinosa na cera extraída com clorofórmio. Buttar et al. (1999) avaliaram a cera bruta da cana-de-açúcar extraída a partir dos solventes apolares hexano, tolueno e clorofórmio, observando que os valores de índice de acidez e de saponificação variaram de 29 a 37,4 mg.g^{-1} e de 109,4 a 115,3 mg.g^{-1} , respectivamente, faixa esta que compreende os valores obtidos neste trabalho a partir da extração da cera bruta com hexano.

O índice de acidez e, conseqüentemente, a quantidade de ácidos graxos livres presentes na cera bruta da cana-de-açúcar é dependente da variedade da planta, do cultivo, das condições e do tipo de solvente utilizados na extração da cera (Balch, 1953). Esta dependência relativa às condições de operação foi observada por alguns autores (Warth, 1956; Azzam, 1986; Bhosale et al. 2012; Oliveira, 2018). Bhosale et al. (2012) avaliaram as características da cera oriunda da utilização da torta do filtro rotativo proveniente de 4 diferentes indústrias sucroalcooleiras, a partir da extração com os solventes tolueno e benzeno. Os autores observaram valores de índice de acidez variando de 4,99 a 5,95 mg.g^{-1} , índice de saponificação de 202,6 a 263,8 mg.g^{-1} e índice de iodo de 22,64 a 29,27 mg.100g^{-1} , respectivamente.

Warth (1956) também observou que dependendo da procedência da cera bruta (Filipinas, Índia e Java), as suas características podem ser afetadas, observando valores de índice de saponificação e acidez variando de 128 a 177 mg.g^{-1} e de 24 a 57 mg.g^{-1} , respectivamente. De acordo com Azzam (1986), as características da cera egípcia de cana-de-açúcar também são alteradas dependendo das diferentes origens da mesma, observando valores de IS variando de 66,20 a 130,70 mg.g^{-1} .

O valor de índice de iodo obtido também ficou na faixa de valores encontrados na literatura. Ao se comparar a cera bruta da cana-de-açúcar com a das ceras de abelha e carnaúba, que possuem índice de iodo variando de 7 a 16 e de 7 a 14 mg.100g^{-1} , respectivamente; percebe-se que as ceras brutas da cana-de-açúcar são mais insaturadas que as ceras abelha e carnaúba, uma vez que apresentam maiores valores de II (Hamilton, 1995; Gunstone e Padley, 1997).

O índice de matéria insaponificável encontrado, se assemelha aos valores relatados por Vieira (2003) e Rozário (2006), à medida em que o baixo valor do índice de matéria insaponificável observado seja coerente com o alto valor de índice de saponificação que a cera bruta apresentou.

Ao se comparar os parâmetros físico-químicos da cera bruta (Tabela 4.1) e os da cera purificada (Tabela 4.2), verifica-se que houve um decréscimo dos índices de acidez, saponificação e iodo após a etapa de purificação. Este mesmo comportamento foi observado por Garcia e Garcia (1996), Vieira (2003) e Gandra (2006). Para a cera bruta foi encontrado teor de ácidos graxos livres (AGL) de $16,8 \pm 0,5\%$, enquanto para a cera purificada foi de $8,7 \pm 0,6\%$. Esta tendência de redução do índice de acidez, saponificação, iodo e teor de ácidos graxos livres, além do aumento do índice de matéria insaponificável, ocorre devido a etapa de purificação, que promove a remoção da fração oleosa e, conseqüentemente, dos ésteres, triglicerídeos, ácidos graxos livres e esterificados que compõe a cera bruta (Vieira, 2003; Wada, 2008).

As diferenças das características obtidas a partir de diferentes métodos de purificação são bem evidentes. O valor de índice de acidez obtido neste estudo ($17,3 \text{ mg.g}^{-1}$) foi próximo aos obtidos por Vieira (2003) ($20,5 \text{ mg.g}^{-1}$) e Oliveira (2018) ($22,6 \text{ mg.g}^{-1}$), que realizaram a extração da cera com hexano e utilizaram o mesmo procedimento de purificação empregado neste.

Tabela 4.2 - Parâmetros físico-químicos da cera purificada da cana-de-açúcar

Referência	Método de Purificação	Parâmetros			
		IA (mg KOH.g ⁻¹)	IS (mg KOH.g ⁻¹)	II - Wijs (mg I.100 g ⁻¹)	MI (%)
Este trabalho	Hexano e acetona	$17,3 \pm 1,2$	$98,7 \pm 3,4$	$13,6 \pm 1,3$	$35,1 \pm 2,7$
Garcia e Garcia (1996)	Álcool a quente	27,0	106,0	21,0	-
Vieira (2003)	Hexano e acetona	$20,5 \pm 0,9$	$77,9 \pm 1,9$	$12,6 \pm 0,9$	$55,6 \pm 1,9$
Gandra (2006)	Álcool a frio	$23,2 \pm 0,6$	$79,1 \pm 1,1$	$22,3 \pm 0,6$	-
Rozário (2006)	Álcool a quente	$39,6 \pm 1,4$	$118,3 \pm 1,2$	$55,7 \pm 0,3$	$50,8 \pm 2,9$
Wada (2008)	Álcool a frio	$13,0 \pm 0,1$	$96,0 \pm 0,3$	$21,0 \pm 0,2$	$48,5 \pm 1,9$
Paixão (2008)	Álcool a frio	$13,2 \pm 0,2$	$96,2 \pm 0,3$	$21,5 \pm 0,2$	$48,5 \pm 1,9$
Lopes (2010)	Álcool a frio	$18,1 \pm 0,3$	$141,0 \pm 0,1$	$20,0 \pm 0,1$	$34,7 \pm 0,3$
Oliveira (2018)	Hexano e acetona	22,6 - 28,9	60,9 - 71,3	-	-

Nota: IA: Índice de Acidez; IS: Índice de Saponificação; II Índice de Iodo. MI: Índice de Matéria Insaponificável.

Rozário (2006) e Garcia e Garcia (1996) realizaram a purificação com álcool a quente, observando os maiores valores de acidez, associado à presença da fração oleosa. Ao invés de uma diminuição, o processo de purificação empregado por

Rozário (2006) propiciou um aumento do IA, indicando que a purificação promoveu uma concentração na cera dos ácidos graxos livres presentes no óleo ou favoreceu a hidrólise de alguns ésteres e triglicerídeos presentes na cera.

Wada (2008), Paixão (2008) e Lopes (2010) caracterizaram a cera da cana-de-açúcar clarificada e purificada com etanol a frio e, encontraram valores inferiores de IA (13,0, 13,2 e 18,1 mg.g⁻¹, respectivamente), ocasionado devido à alta eficiência na extração da fração oleosa da etapa de purificação. Embora também tenha realizado a purificação com etanol a frio, Gandra (2006) obteve valores um pouco superior (23,2 mg.g⁻¹), provavelmente em decorrência da cera estudada ter sido composta apenas da fração de ésteres de cera, sem a presença de resinas (fração dura).

O valor do índice de saponificação encontrado na cera purificada deste estudo é um indicativo de alto teor de ésteres, triglicerídeos, ácidos graxos livres e esterificados presentes na mesma.

Os valores de II apresentam uma grande variação (12,6 - 55,7 mg.100g⁻¹), possivelmente devido ao método de purificação empregado. O processo de purificação favorece a remoção da fase oleosa (triglicerídeos e ácidos graxos) presente na cera, além também de substâncias saponificáveis, razão pela qual a cera purificada apresenta maior teor de matéria insaponificável quando comparado à cera bruta, o que é um indicativo de que a etapa de purificação promoveu uma maior concentração da fração de éster na amostra (Vieira, 2003; Rozário, 2006).

A cera purificada também apresentou índices analíticos comparáveis aos das ceras comerciais de abelha, candelila, carnaúba, lanolina, ouricuri (*Syagrus coronata*) e jojoba (*Simmondsia chinensis*), conforme observado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Propriedades físico-químicas de diferentes ceras comerciais

Propriedades	Cera de Abelha	Cera de Carnaúba	Cera de Candelila	Cera de Lanolina	Cera de Ouricuri	Cera de Jojoba
Índice de Acidez (mg KOH.g ⁻¹)	17 - 36	3 - 10	12 - 22	7 - 15	8 - 20	2
Índice de Saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	90 - 149	79 - 95	35 - 87	100 - 110	70 - 100	92
Índice de Iodo (mg I.100g ⁻¹)	7 - 16	7 - 14	14 - 45	15 - 30	6 - 8	82

Fonte: Adaptado de Hamilton (1995), Gunstone e Padley (1997) e Sin (2012)

4.3.2 Solubilidade da cera bruta

Os dados de solubilidade da cera da cana-de-açúcar são muito escassos e o conhecimento desta propriedade é essencial para sua aplicação em diferentes segmentos industriais. De acordo com Warth (1956), a cera bruta da cana-de-açúcar apresenta solubilidade parcial em diferentes solventes, conforme apresentado na Tabela 4.4; e é solúvel em clorofórmio, álcool amílico e éter etílico quente, uma vez que estes solventes são capazes de promover a dissolução até certo ponto, depositando pequenos grãos de cristal no resfriamento.

Tabela 4.4 - Solubilidade parcial da cera bruta da cana-de-açúcar

Solvente	Volume (mL)	Temperatura (°C)	Massa de cera (g)
Etanol USP (95%)	100	25	5,9
Terebentina	100	35	0,1
Dicloreto de Etileno	100	37	1,6
Nafta Leve	100	39	0,1
Acetato de Etila	100	44	0,1
Butanol	100	57	0,1
Benzeno	100	67	0,1

Fonte: Warth (1956)

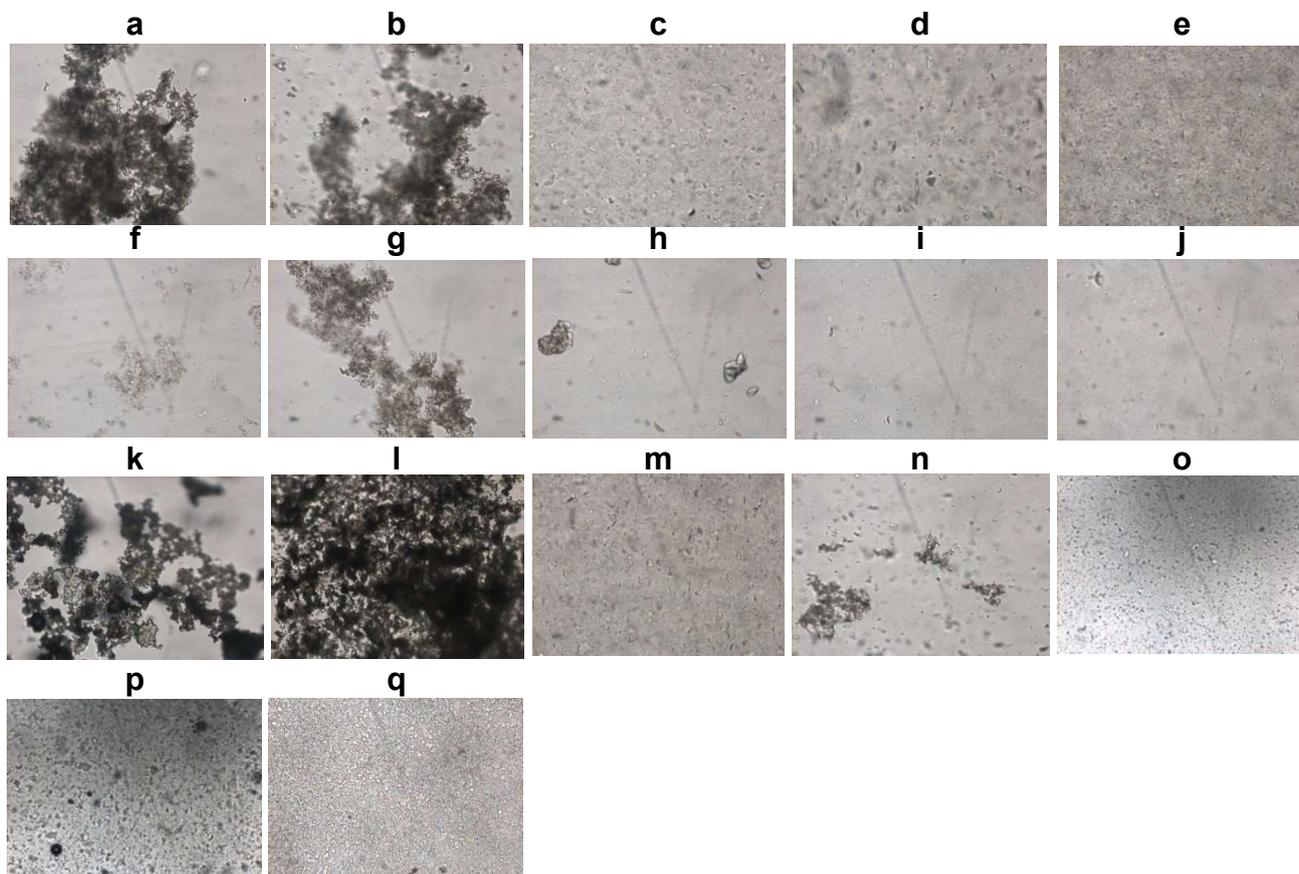
Neste estudo foi avaliada a dissolução da cera bruta em diferentes solventes para se ter um indicativo de tal propriedade, e o comportamento de solubilidade das amostras analisadas está apresentado na Figura 4.6.

Observa-se que após 72 h a cera bruta foi melhor dissolvida em limoneno, terebentina e clorofórmio à medida em que a ocorrência de grânulos ou partículas não dissolvidas do material foi menor quando comparadas às demais imagens. Vale salientar que as placas utilizadas na análise do microscópio possuíam alguns arranhões, entretanto o mesmo perfil de ranhuras foi observado em todas as imagens.

Dentre os solventes que apresentaram a maior capacidade de dissolução da cera, o limoneno e a terebentina apresentaram maior eficiência além de serem os mais recomendados, uma vez que são classificados como “amarelos”, enquanto o clorofórmio é classificado como um solvente “vermelho”, de uso perigoso (Byrne et al., 2016). Devido à natureza do clorofórmio, não foram realizados testes envolvendo o aquecimento deste. A microscopia óptica foi utilizada para fornecer uma

representação da tendência da solubilidade da cera bruta em limoneno e terebentina a 30, 40 e 50 °C, conforme Figura 4.7.

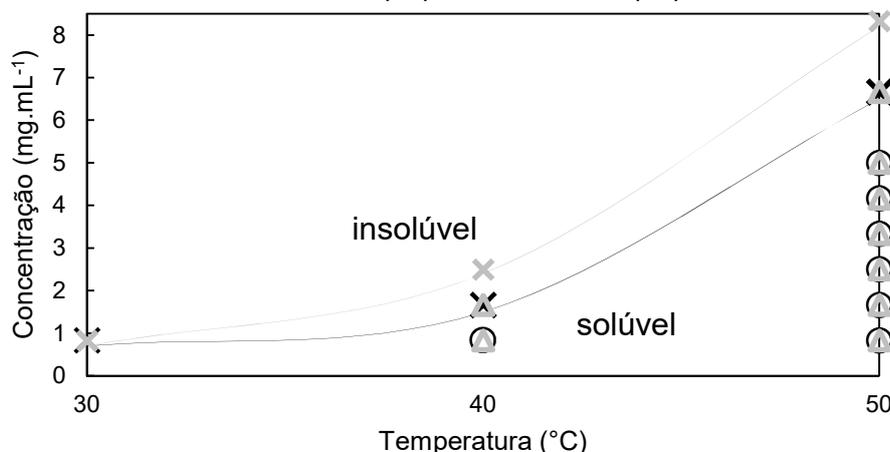
Figura 4.6 - Imagens capturadas pela microscopia óptica (100x a 30 °C) da solubilidade da cera bruta da cana-de-açúcar em diferentes solventes



Legenda: (a) metanol, (b) etanol, (c) decanol, (d) dimetilsulfóxido, (e) acetato de etila, (f) hexano, (g) acetona, (h) clorofórmio, (i) terebentina, (j) limoneno, (k) água, (l) acetonitrila, (m) etanolamina-mono, (n) ácido acético, (o) ácido octanóico, (p) ácido láctico, (q) éter etílico.

A 30 °C, a cera bruta não foi completamente dissolvida na menor concentração avaliada (0,83 mg.mL⁻¹), sendo necessários mais estudos para determinar a máxima solubilidade da cera nessa condição. A terebentina apresentou uma maior capacidade do que o limoneno para solubilizar a cera bruta a 40 e 50 °C, provavelmente por ser uma mistura de isômeros (α e β pineno). O aumento da temperatura permitiu um aumento na energia cinética, favorecendo uma maior separação das moléculas de cera e, conseqüentemente, maior solubilidade. Esse comportamento é característico da regra geral de solubilidade, o que implica que se trata de um processo de dissolução endotérmica (Fathi-Azarjbayjani et al., 2016; Kim et al., 2018).

Figura 4.7 - Comportamento de solubilidade da cera de cana-de-açúcar em limoneno(—) e terebentina(—)



Legenda: (O) concentrações nas quais a cera pode ser completamente dissolvida em limoneno e (Δ) terebentina; (X) concentração nas quais a dissolução não é mais possível em limoneno e (x) terebentina. A linha sólida é para guiar o olho como um limite máximo aproximado de concentração de cera possível de se dissolver nesses solventes

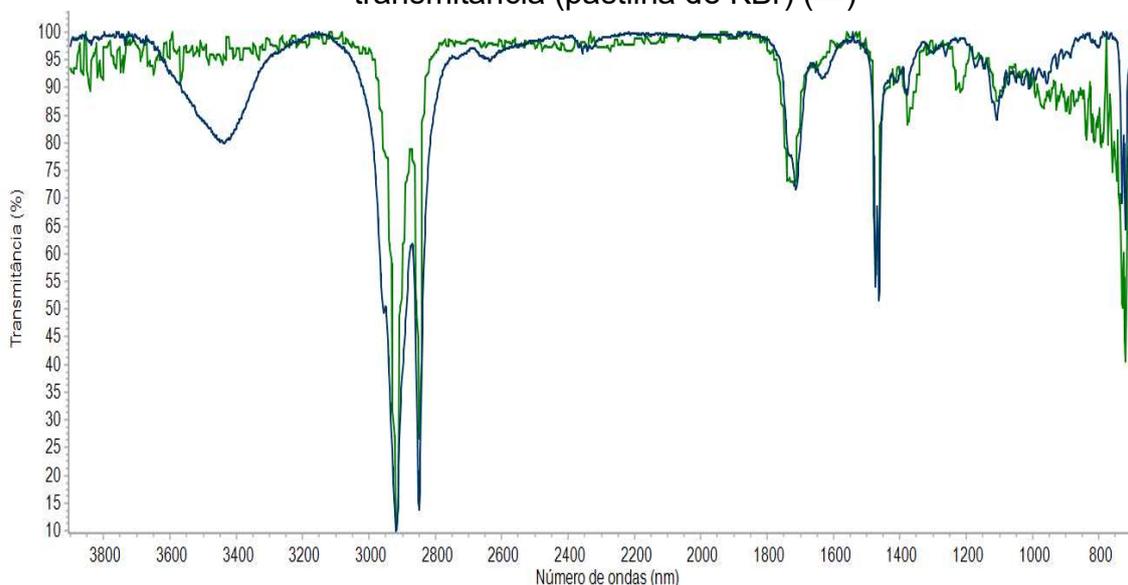
4.3.3 Espectroscopia no FTIR

Para ajudar a elucidar a estrutura complexa da cera, identificar os principais grupos funcionais presentes na mesma e também verificar qual a técnica de espectroscopia mais adequada para a análise das amostras, foram realizadas análises da espectroscopia de transmissão por pastilhas de brometo de potássio (KBr) e espectroscopia de Reflexão Interna ou Refletância Total Atenuada (ATR), conforme espectros apresentados na Figura 4.8. Para todas as análises a linha base foi corrigida e o espectros normalizados em relação à altura do maior pico (CH em 2920 cm⁻¹), para assegurar que a intensidade do infravermelho fosse a mais semelhante possível entre os espectros registrados.

Inicialmente foi realizada a análise no modo ATR, uma vez que este método é amplamente utilizado por ser rápido, fácil, não destrutivo, com espectros de alta qualidade e mais eficiente em termos do tempo de análise, quando comparada a técnica de transmitância (Chen et al., 2015), sendo empregado também por diferentes autores para análise de constituintes de ceras vegetais (Gandra, 2006; Athukorala et al., 2009; Ipatzi, 2016; Oliveira, 2018; Ramos-Zambrano et al., 2019). Entretanto, a não observância de uma banda larga característica de OH, que indica a presença de álcoois (entre 3650 e 3200 cm⁻¹) ou ácidos carboxílicos (3400 - 2400 cm⁻¹), induziu a realização de uma nova análise no modo de transmitância com pastilhas de KBr

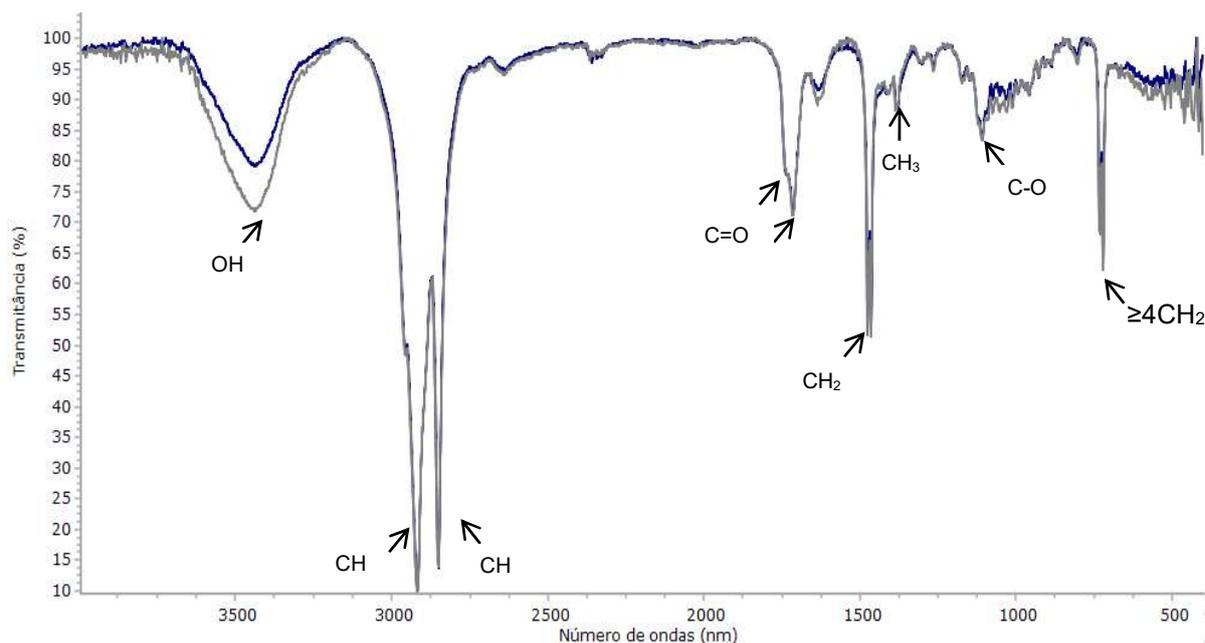
também utilizado para análise de constituintes de ceras (Isbell et al., 1996; Oliveira, 2011; Inarkar e Lele, 2012; Ishaka et al., 2014; Qi et al., 2017; Ma et al., 2018).

Figura 4.8 - Espectros do FTIR da cera bruta analisada no modo ATR (—) e por transmitância (pastilha de KBr) (—)



Embora os espectros sejam parecidos, pequenas variações em relação a intensidade e posição dos picos podem ocorrer. Como na espectroscopia de transmitância o infravermelho interage diretamente com a matriz, não ocorrendo nenhum fenômeno de reflexão; em muitos casos os espectros apresentam qualidade superior aos espectros por ATR (Smith, 2011; Chen et al., 2015), justificando a maior acurácia da técnica de transmitância para a análise dos componentes de cera. Para fins comparativos, o FTIR do padrão de octacosanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO - EUA) analisado em modo ATR e transmitância (pastilha de KBr), juntamente com um espectro do octacosanol encontrado na literatura (modo transmitância, pastilha de KBr) (Guidechem, 2021) são apresentados no Apêndice B (Figura A2).

Por apresentar maior estabilidade da linha base e melhor definição da banda referente a presença de OH, optou-se por conduzir as demais análises a partir da técnica de espectroscopia por transmitância utilizando pastilhas de KBr. Os espectros comparativos entre a ceras bruta e purificada da cana-de-açúcar são apresentados na Figura 4.9 e, os valores e atribuições destas bandas, com absorção na região de 4000 a 400 cm^{-1} , na Tabela 4.5.

Figura 4.9 - Espectros do FTIR da cera bruta (—) e purificada (—)

Os alcanos são caracterizados por apresentarem espectros geralmente simples e com poucos picos; ocorrendo nas formas de CH, CH₂, CH₃ e ≥4CH₂, que estão associados, respectivamente, à presença da fração alifática da cera (2920 e 2840 cm⁻¹), grupo metileno (1460 cm⁻¹), grupo metila (1375 cm⁻¹) e grupos com pelo menos 4 CH₂ ligados entre si (724 cm⁻¹), que também é observada em óleos e triglicerídeos (Guillén e Cabo, 1997; Albuquerque et al., 2003; Qi et al., 2017). Uma vez que o estiramento C-C se apresenta na forma de picos muito fracos, sua interpretação não é comumente realizada (Pavia et al., 2008).

Tabela 4.5 - Análise de componentes de banda dos espectros de FTIR da cera da cana-de-açúcar

Grupo Funcional		Tipo de vibração	Banda (n° de onda, cm ⁻¹)	Intensidade
C-H	CH	Estiramento	3000 - 2800	Forte
	CH ₃	Dobramento	1450 e 1375	Médio
	CH ₂	Dobramento	1460 - 1465	Médio
	≥4CH ₂	Dobramento	720	Médio
C=O	Ácido carboxílico	Estiramento	1730 - 1700	Forte
	Ester	Estiramento	1750 - 1735	Forte
C-O	Álcoois, ésteres e ácidos carboxílicos	Estiramento	1320 - 1000	Forte
OH	Álcool	Estiramento	3650 - 3200	Médio
	Ácido carboxílico	Estiramento	3400 - 2400	Médio
C-O-H	Álcool	Dobramento	1440 - 1220	Fraco

Fonte: Silverstein, et al. (2005) e Pavia et al. (2008).

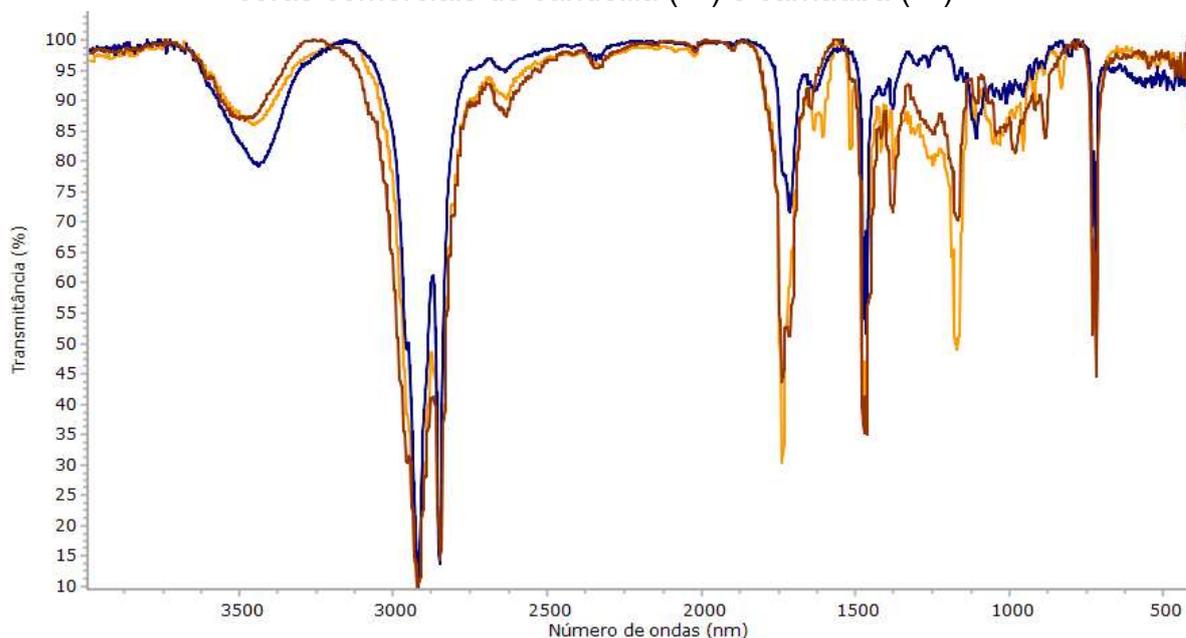
Nos espectros da Figura 4.9 observa-se uma banda de absorção na região de 3440 cm^{-1} , que é característica da ligação OH, correspondente ao policosanol com ligações de hidrogênio intermolecular. Os álcoois aparecem em bandas intensas centradas entre 3400 e 3200 cm^{-1} . Quando o álcool analisado está em uma solução (o que não se aplica para este caso), é possível observar uma banda nítida e fraca de álcool livre a esquerda da banda de OH com ligações de hidrogênio intermolecular, na região de 3650 a 3600 cm^{-1} (Pavia et al., 2008).

A deformação angular do C-O-H, também denota a presença de álcoois, porém na forma de picos amplos, fracos e de difícil visualização na região de 1440 a 1220 cm^{-1} . Esses picos geralmente ficam sobrepostos pelo pico correspondente à deformação angular do CH_3 , que apresenta forte intensidade próximo a 1375 cm^{-1} e é adjacente à carbonila (Silverstein et al., 2005). No espectro também pode ser observada a presença do estiramento em 1160 cm^{-1} , característico de C-O, que denota a presença de ésteres, álcoois e/ou ácidos graxos. O grupo carbonila (C=O) existente no espectro pode apresentar-se na forma de ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos, cetonas, amidas, cloretos ácidos e anidridos. Por terem sido observados estiramentos C=O com valores de 1737 e 1713 cm^{-1} , associa-se os mesmos a presença dos grupos éster e ácido carboxílico, respectivamente. A vibração de estiramento deste grupo absorve fortemente na faixa de 1820 a 1660 cm^{-1} por causa de sua grande mudança no momento dipolar (Pavia et al., 2008).

Os espectros da Figura 4.9 apresentaram bandas de absorção similares às da cera de abelha (Knuutinen e Norrman, 2000), palha de linho (Athukorala et al., 2009), bagaço (Qi et al., 2017) e casca da cana-de-açúcar (Inarkar e Lele, 2012; Oliveira, 2018), além das ceras comerciais de carnaúba e candelila, conforme apresentado na Figura 4.10, o que indica a presença de características estruturais semelhantes às encontradas em óleos e gorduras (Guillén e Cabo, 1997; Albuquerque et al., 2003).

Embora a técnica de FTIR indique a presença de bandas características de álcool e éster, a mesma possui algumas limitações uma vez que não possibilita aportar mais informações a respeito dos teores destes constituintes, sendo requerida a utilização de outras técnicas de caracterização, como a cromatografia a gás que também foi abordada neste trabalho.

Figura 4.10 - Espectros do FTIR da cera bruta da cana de açúcar (—) e das ceras comerciais de candelila (—) e carnaúba (—)



4.3.4 Propriedades térmicas

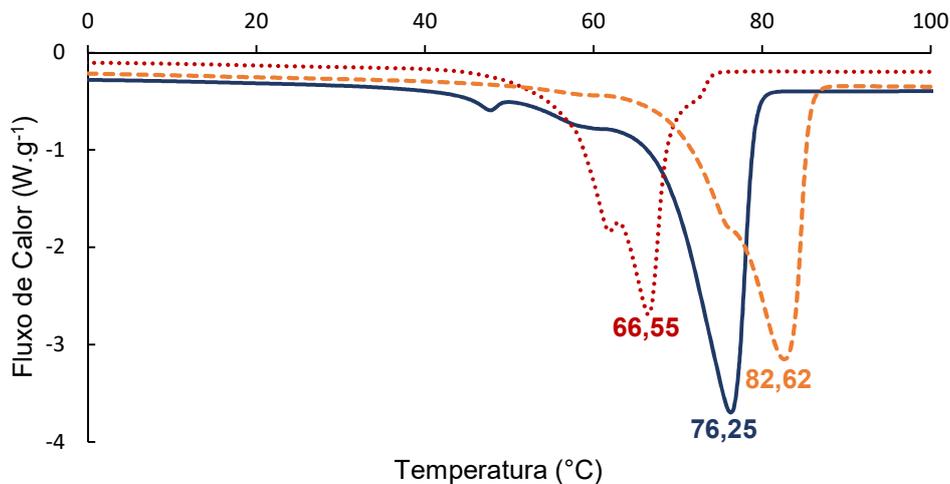
O comportamento térmico da cera foi investigado a partir da determinação de sua temperatura de decomposição, solidificação, fusão, assim como as entalpias de transição do material.

4.3.4.1 Calorimetria exploratória diferencial

A análise de termogramas é muito útil para a caracterização de ceras, uma vez que o formato das curvas, a faixa de fusão e as diferenças na transição de fases estão relacionados com a composição química da cera e sua história térmica (Nassu, 1994; Vieira, 2003). Para a análise via DSC, as amostras foram inicialmente aquecidas, para remoção de qualquer histórico térmico anterior e, em seguida, resfriadas e submetidas a um novo aquecimento. Os termogramas de fusão apresentados (Figura 4.11, 4.12a e 4.13a) são correspondentes à etapa do segundo ciclo de aquecimento da amostra.

Para fins comparativos, os termogramas de fusão das ceras comerciais de carnaúba e candelila também foram avaliados, conforme apresentado na Figura 4.11.

Figura 4.11 - DSC de fusão da cera bruta da cana-de-açúcar (—) e das ceras comerciais de candelila (····) e carnaúba (---)



A cera bruta da cana-de-açúcar apresenta um pico de fusão mais estreito e bem definido quando comparado as ceras de candelila e carnaúba, que compreende à faixa de 40 a 80 °C, o que é indicativo de maior homogeneidade e pureza quando comparada às ceras comerciais. A alta abundância de tipos específicos de compostos na cera, como álcoois e aldeídos de cadeia longa, pode ser responsável pela observação destes picos mais estreitos e altos (Attard et al., 2015). Para fins comparativos, no Apêndice B (Figura A3) é apresentando o termograma de fusão do padrão octacosanol, que apresenta pico estreito e de alta intensidade, o que é característico de amostras mais puras.

Como a transição de fase da fusão é endotérmica, são observados fluxos de calor negativos nos termogramas. A cera bruta da cana-de-açúcar apresentou temperatura de pico de fusão de 76,25 °C, enquanto as ceras de candelila e carnaúba apresentaram temperaturas de 66,55 e 82,62 °C, respectivamente. Também é possível observar um pico de menor intensidade, principalmente na amostra de cera de candelila, o que evidencia a presença de outros componentes na amostra.

A cera bruta da cana-de-açúcar apresentou ponto de fusão inferior a ceras de outras naturezas relatadas na literatura, como a cera do sorgo (85 °C) (Weller et al., 2000), farelo de arroz (75 - 78 °C) (Vali et al., 2002), carnaúba (78 - 85 °C), ouricuri (82 - 84 °C) e, superior à cera da candelila (66 - 69 °C), palha do linho (55 - 67 °C) (Athukorala et al., 2009); cera de abelha (62 - 65 °C), lanolina (32 - 42 °C) e jojoba (~7 °C) (Hamilton, 1995; Gunstone e Padley, 1997).

Os valores de temperatura de fusão da cera bruta da cana-de-açúcar observados são similares aos relatados por Azzam (1984), que determinou uma faixa de fusão de 74 a 81 °C para a cera egípcia de cana-de-açúcar. Outros pesquisados também observaram valores de ponto de fusão da cera bruta dentro da faixa anteriormente apresentada, como foi o caso de Vieira (2003) (77,7 °C) Gandra (2006) (75,6 °C) e Rozário (2006) (71,6 °C).

O solvente empregado na etapa de extração também promove significativa influência no ponto de fusão da amostra de cera, pois dependendo do solvente outras espécies químicas podem ser extraídas. García et al. (2003) observaram ponto de fusão de 89,4 e 73,7 °C, para cera bruta da cana-de-açúcar extraída com tolueno e tricloroetileno, respectivamente. Oliveira (2018) também observou alterações nas propriedades térmicas da cera extraída utilizando limoneno e pineno, que apresentaram temperaturas de fusão de 50,6 e 50,4 °C, respectivamente, enquanto a cera extraída com hexano apresentou temperatura de fusão de 75,9 °C.

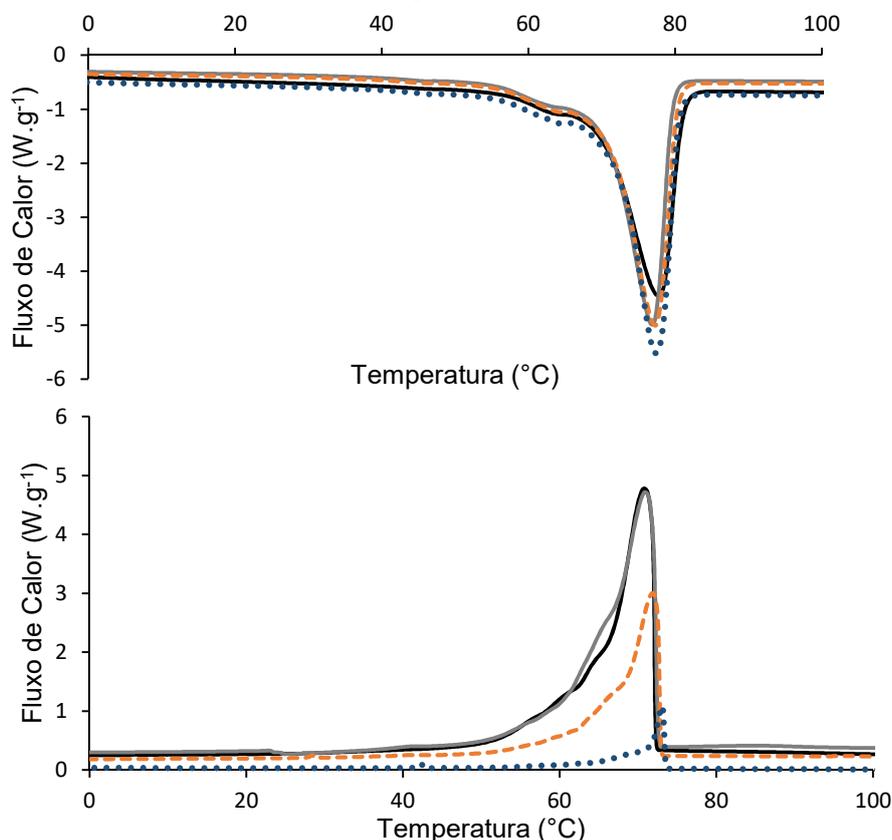
A energia a ser fornecida à amostra para que ocorra uma completa fusão, que corresponde ao calor latente, também foi avaliada. O valor de entalpia é determinado a partir da área do pico e foi observado valor de entalpia de fusão de $-130,49 \text{ J.g}^{-1}$, valor este próximo ao observados por outros autores na literatura, como Vieira (2003) ($-125,87 \text{ J.g}^{-1}$), Gandra (2006) ($-101,6 \text{ J.g}^{-1}$) e Oliveira (2018) ($-129,82 \text{ J.g}^{-1}$).

Foram avaliados 4 métodos para conduzir a análise da cera purificada, variando as rampas de temperatura e os períodos das isotermas. Os termogramas assim como as temperaturas e entalpias de fusão e solidificação obtidos a partir dos métodos avaliados estão apresentados na Figura 4.12 e Tabela 4.6, respectivamente. O comportamento das ceras não apresentou variações muito significativas entre os métodos avaliados, com temperaturas de fusão e solidificação variando de 76,98 a 77,81 °C e de 70,87 a 73,04 °C, respectivamente.

Os métodos 4, 2 e 3 foram empregados modificando-se apenas a taxa de resfriamento de 10, 5 e 1 °C.min⁻¹, respectivamente, no intuito de observar se a solidificação da cera poderia sofrer alterações de acordo com a taxa utilizada. O emprego de menores taxas de resfriamento pode favorecer a organização das moléculas que tendem a se dissolver com maior facilidade em amostras líquidas devido a maior área de contato (Vieira, 2003). A medida em que se diminuiu a taxa de resfriamento da cera (Método 4 > Método 2 > Método 3), foi observado o aumento da

altura dos picos de fusão. A mesma tendência foi observada por Liu et al. (1994), ao analisar o comportamento de fusão da cera isolada do óleo de canola.

Figura 4.12 - DSC de (a) fusão e (b) solidificação da cera purificada sob diferentes condições de análise



Legenda: Método 1 (—): 25 a 105 °C (1 min); 105 a -10 °C (1 min); -10 a 105 °C a 10 °C.min⁻¹;
 Método 2 (---): 25 a 105 °C (20 min); 105 a -10 °C (20 min) (5 °C.min⁻¹); -10 a 105 °C a 10 °C.min⁻¹;
 Método 3 (···): 25 a 105 °C (20 min); 105 a -10 °C (20 min) (1 °C.min⁻¹); -10 a 105 °C a 10 °C.min⁻¹;
 Método 4 (—): 25 a 105 °C (20 min); 105 a -10 °C (20 min) (10 °C.min⁻¹); -10 a 105 °C a 10 °C.min⁻¹.

Tabela 4.6 - Temperaturas e entalpias de fusão e solidificação da cera purificada sob diferentes condições de análise

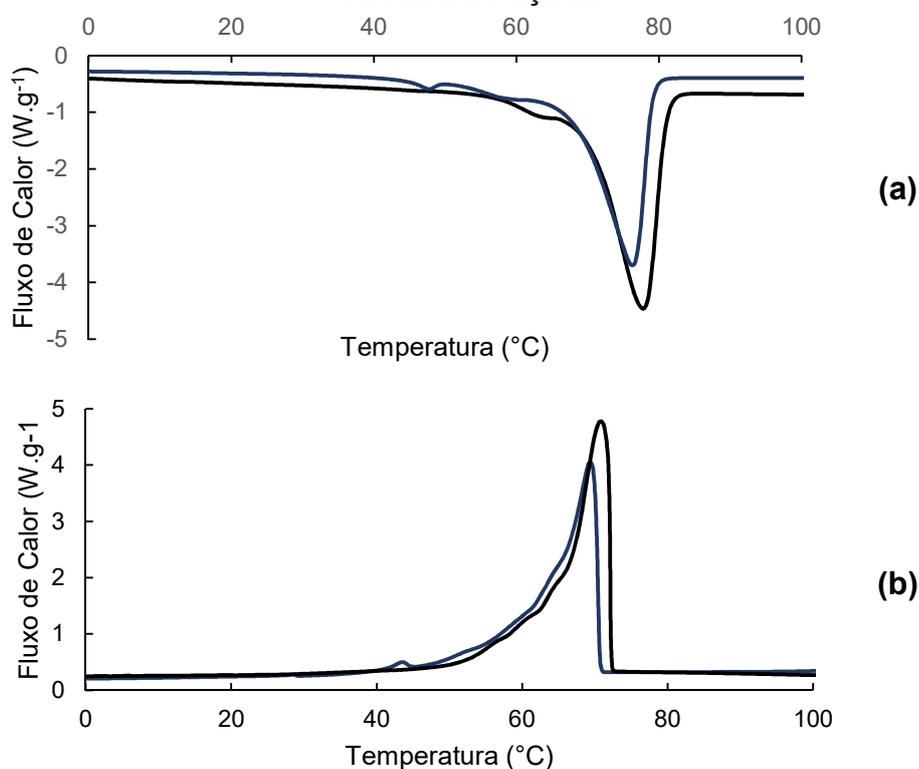
	Fusão			Solidificação		
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	Entalpia ΔH (J.g ⁻¹)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	Entalpia ΔH (J.g ⁻¹)
Método 1	70,17	77,81	-149,33	72,36	70,87	189,51
Método 2	70,92	77,34	-155,08	72,91	71,81	204,12
Método 3	71,82	77,35	-161,35	73,48	73,04	204,86
Método 4	70,53	76,98	-150,84	72,67	70,96	197,67

Nota: Método 1: 25 a 105 °C (1 min); 105 a -10 °C (1 min); -10 a 105 °C a 10 °C.min⁻¹;
 Método 2: 25 a 105 °C (20 min); 105 a -10 °C (20 min) (5 °C.min⁻¹); -10 a 105 °C a 10 °C.min⁻¹;
 Método 3: 25 a 105 °C (20 min); 105 a -10 °C (20 min) (1 °C.min⁻¹); -10 a 105 °C a 10 °C.min⁻¹;
 Método 4: 25 a 105 °C (20 min); 105 a -10 °C (20 min) (10 °C.min⁻¹); -10 a 105 °C a 10 °C.min⁻¹.

De forma geral, o perfil dos termogramas não se alterou significativamente, não sofrendo alterações significativas de acordo com o emprego de diferentes métodos de análise. De posse destas considerações, conclui-se que a partir do método 1 foram alcançados os melhores resultados em termos de rapidez e custo do processo de análise, à medida em que se utilizou isoterma de 1 min e maior taxa de resfriamento e aquecimento ($10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$); além também da observação de um elevado ponto de fusão, o que pode possibilitar a utilização da cera purificada para diferentes aplicações.

Os valores de ponto de fusão da cera purificada da cana-de-açúcar foram comparáveis aos valores observados por diferentes autores, com valores de $81\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Vieira, 2003), $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rozário, 2006), $72 - 75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Phukan e Boruah, 1999), $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Wada, 2008; Paixão, 2008), $72 - 77\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Oliveira, 2018), $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lopes, 2010), $77 - 78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (García et al. 1999), $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gandra, 2006), $79\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Paturau, 1989), $79 - 81\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Balch, 1953) e $79 - 83\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Azzam, 1984 e 1986). Os termogramas de fusão e solidificação das ceras bruta e purificada estão apresentados na Figura 4.13.

Figura 4.13 - DSC de (a) fusão e (b) solidificação da cera bruta (—) e purificada (—) da cana-de-açúcar



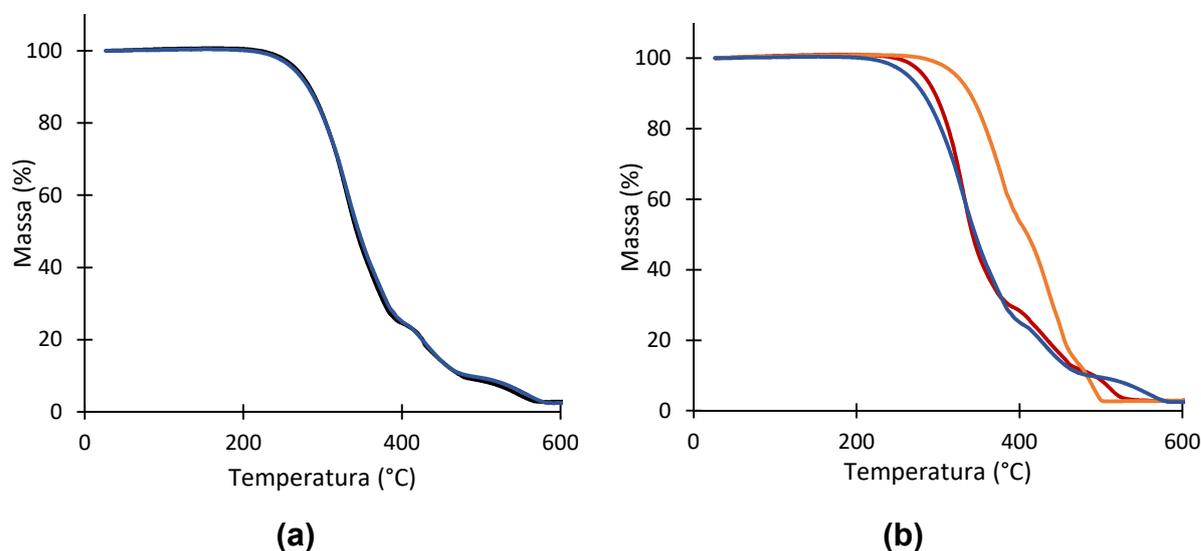
É notável uma ligeira diferença entre as temperaturas de fusão das amostras, uma vez que esta propriedade é dependente principalmente da proporção dos constituintes nas ceras e do processo de purificação (Frutuoso, 1989; Paixão, 2008).

O comportamento das curvas no termograma de solidificação (Figura 4.13b), segue a mesma tendência do termograma de fusão (Figura 4.13a), com maior T_{pico} e intensidade nas amostras de cera purificada. Este comportamento indica que o processo de purificação empregado promoveu a obtenção de um material mais resistente termicamente, mais homogêneo e com maior pureza em relação à composição dos lipídios (Vieira, 2003).

4.3.4.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica da cera da cana-de-açúcar e, os termograma expressos em termos da porcentagem da massa perdida e da temperatura estão apresentados na Figura 4.14.

Figura 4.14 - Termogramas das ceras (a) bruta (—) e purificada (—) da cana-de-açúcar, além das ceras comerciais de (b) carnaúba (—) e candelila (—)



As ceras bruta e purificada (Figura 4.14a) apresentaram padrão de decomposição muito semelhante, sendo observadas perdas mais apreciáveis a temperaturas superiores a 210 °C, e completa pirólise a partir de 580 °C.

Para fins comparativos, as ceras comerciais de carnaúba e candelila também foram analisadas (Figura 4.14b), apresentando comportamento similar ao da cera bruta da cana-de-açúcar, entretanto com uma menor estabilidade térmica desta. Foi

observada uma maior estabilidade da cera de carnaúba, seguida pela de candelila e cana-de-açúcar, com decomposição iniciada a partir de 270, 240 e 210 °C, respectivamente.

O principal objetivo deste capítulo foi realizar a caracterização da matéria-prima utilizada (casca da cana-de-açúcar), identificar a melhor condição de extração, e então caracterizar as ceras brutas e purificadas quanto às suas propriedades físico-químicas e térmicas. Esta etapa foi muito importante para a realização deste trabalho pois permitiu conhecer as características do material de estudo e compará-las às propriedades de ceras relatadas por outros autores da literatura.

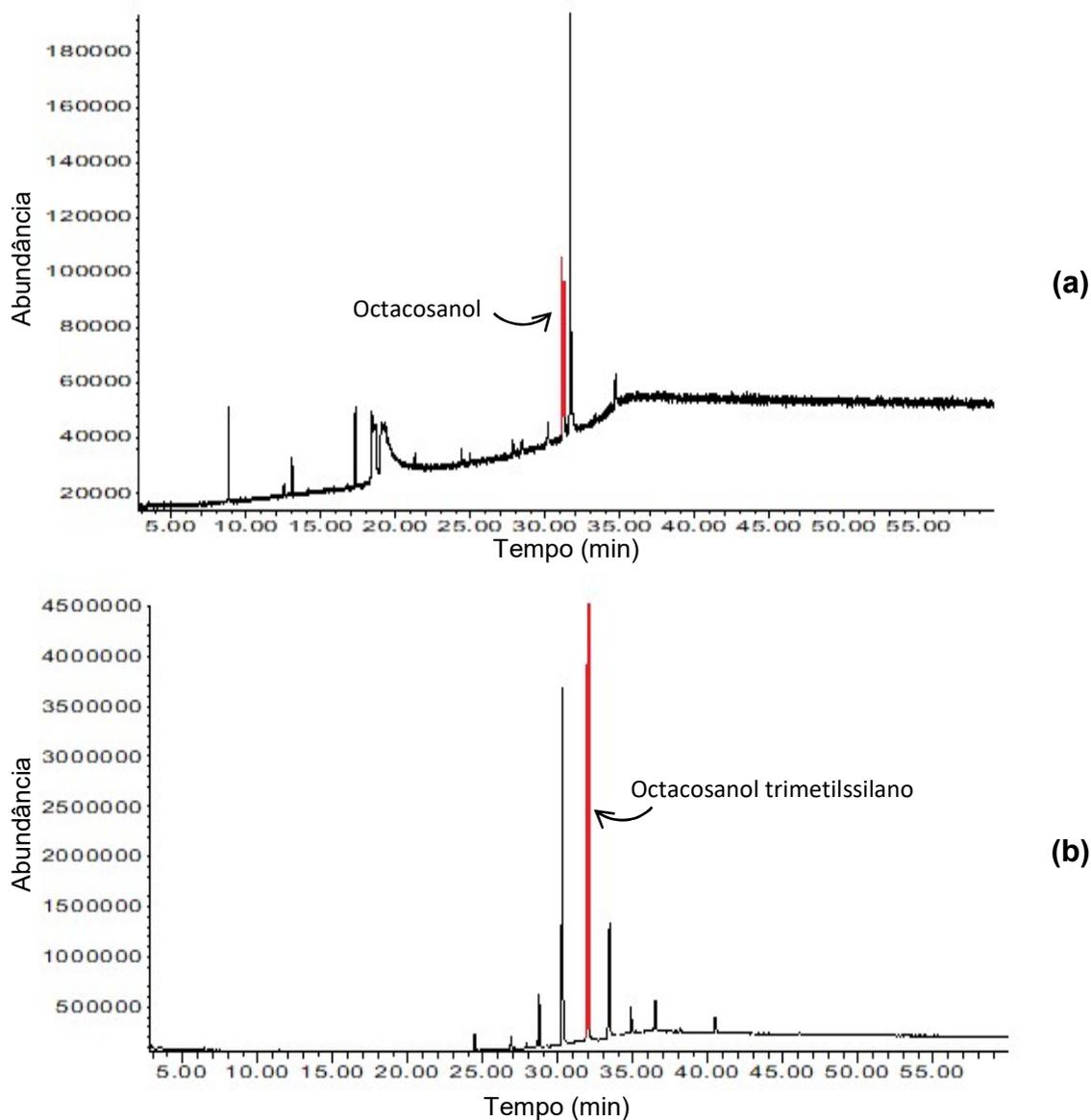
Para avaliar o teor de octacosanol, foi necessário conduzir uma reação de derivatização, de modo a modificar um determinado grupo funcional contido nas ceras e permitir a separação cromatográfica do octacosanol. Os métodos de derivatização avaliados assim como os resultados pertinentes a estas análises são apresentados no tópico a seguir.

4.4 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.4.1 Derivatização

Foram avaliados dois métodos de derivatização (alquilação e sililação), que consistem em uma modificação química de um determinado grupo funcional de um analito, de modo a permitir separações cromatográficas mais eficientes. Lopes (2010) avaliou três diferentes métodos de alquilação (metilação), observando que o utilizado por Hartman e Lago (1973) possibilitou a obtenção dos maiores rendimentos de álcoois graxos (31,6%), enquanto os utilizados por Lepage e Roy (1986) e Mendez et al. (2008), apresentaram os valores de 22,5 e 21,8%, respectivamente. Sendo assim, foi realizada derivatização na forma de metilação conforme procedimento proposto por Hartman e Lago (1973).

O outro método avaliado consistiu na sililação com o reagente MSTFA, para promover a substituição do hidrogênio ativo do grupo hidroxila (-OH) do álcool por um grupo trimetilsilil [-Si(CH₃)₃], que possibilita uma redução de polaridade do composto e de suas ligações de hidrogênio. Neste sentido a metilação foi empregada para avaliar a presença de ácidos graxos que poderiam interferir na análise das amostras, possibilitando também analisar os álcoois graxos, enquanto a sililação foi utilizada para analisar efetivamente a presença de álcoois graxos. Os cromatogramas obtidos a partir dos métodos de derivatização avaliados estão apresentados na Figura 4.15.

Figura 4.15 - Cromatograma da cera purificada após (a) metilação e (b) sililação

De acordo com Figura 4.15a (amostra metilada), os picos que apresentam maiores intensidades são referentes ao octacosanol ($t_R = 31,139$ min) e éster metílico do ácido octacosanóico ($t_R = 31,662$ min).

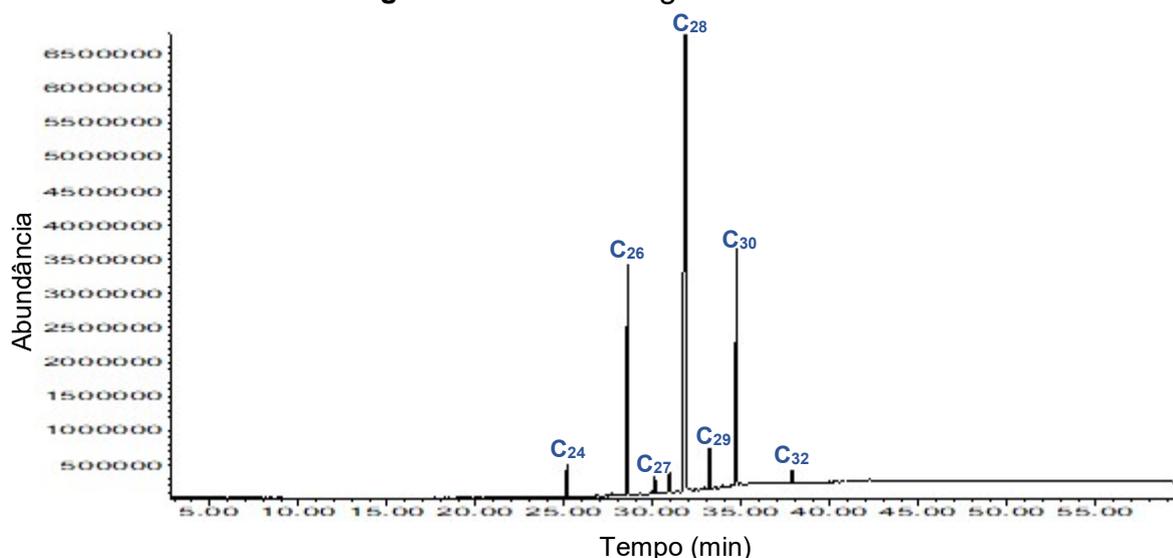
Embora tenha sido utilizada a mesma programação de temperatura, no cromatograma da amostra sililada (Figura 4.15b) são observados picos mais estreitos, simétricos, e com a linha base mais uniforme, promovidos pela maior volatilidade e estabilidade dos derivados sililados dos álcoois graxos. O pico referente ao octacosanol nas amostras metilada e sililada (t_R de 31,139 a 31,956 min, respectivamente) teve sua abundância aumentada em aproximadamente 45 vezes a partir da reação de sililação. Diante do exposto, optou-se por realizar a derivatização

por meio da sililação para conduzir as análises subsequentes, uma vez que o detector do cromatógrafo a gás é mais sensível à presença dos álcoois sililados em comparação aos álcoois livres.

4.4.2 Análise da mistura comercial de álcoois graxos (Lesstanol®)

A mistura comercial de álcoois graxos (C₂₄-C₃₂) (Lesstanol®) foi sililada e analisada, conforme apresentado na Figura 4.16, sendo confirmada a presença dos álcoois graxos após comparação entre o padrão de fragmentação da amostra e o espectro de massas obtidos da biblioteca NIST-11. Os espectros de massas da varredura completa de todos os derivados do Lesstanol® sililados foram identificados com base nos padrões de fragmentos de massa dos espectros dos derivados de trimetilsilil, que tem por característica um íon molecular mais abundante e a perda de uma unidade de CH₃.

Figura 4.16 - Cromatograma do Lesstanol® sililado



Legenda: C₂₄ (tetracosanol), C₂₆ (hexacosanol), C₂₇ (heptacosanol), C₂₈ (octacosanol), C₂₉ (nonacosanol), C₃₀ (triacontanol) e C₃₂ (dotriacontanol)

A identificação dos compostos, porcentagens relativas, fórmulas e massas moleculares dos álcoois graxos oriundos da mistura comercial Lesstanol® são apresentados na Tabela 4.7. Não foi possível identificar 2 analitos (porcentagem relativa de 2,11%), visto que o Lesstanol® apresenta pureza mínima de 90%, conforme especificação apresentada no Apêndice C.

Tabela 4.7 - Analitos presentes no Lesstanol[®] sililado

t_R (min)	Identificação	% Relativa	Fórmula molecular	MM (u.m.a.)
25,143	Tetracosanol trimetilssilano	1,75	$C_{24}H_{49}OSi(CH_3)_3$	426
28,553	Hexacosanol trimetilssilano	14,37	$C_{26}H_{53}OSi(CH_3)_3$	454
30,112	Heptacosanol trimetilssilano	0,96	$C_{27}H_{55}OSi(CH_3)_3$	468
30,875	n.i.	0,89	-	-
30,932	n.i.	1,22	-	-
31,823	Octacosanol trimetilssilano	60,41	$C_{28}H_{57}OSi(CH_3)_3$	482
33,191	Nonacosanol trimetilssilano	2,26	$C_{29}H_{59}OSi(CH_3)_3$	496
34,705	Triacotanol trimetilssilano	17,10	$C_{30}H_{61}OSi(CH_3)_3$	510
37,848	Dotriacotanol trimetilssilano	1,06	$C_{32}H_{65}OSi(CH_3)_3$	538

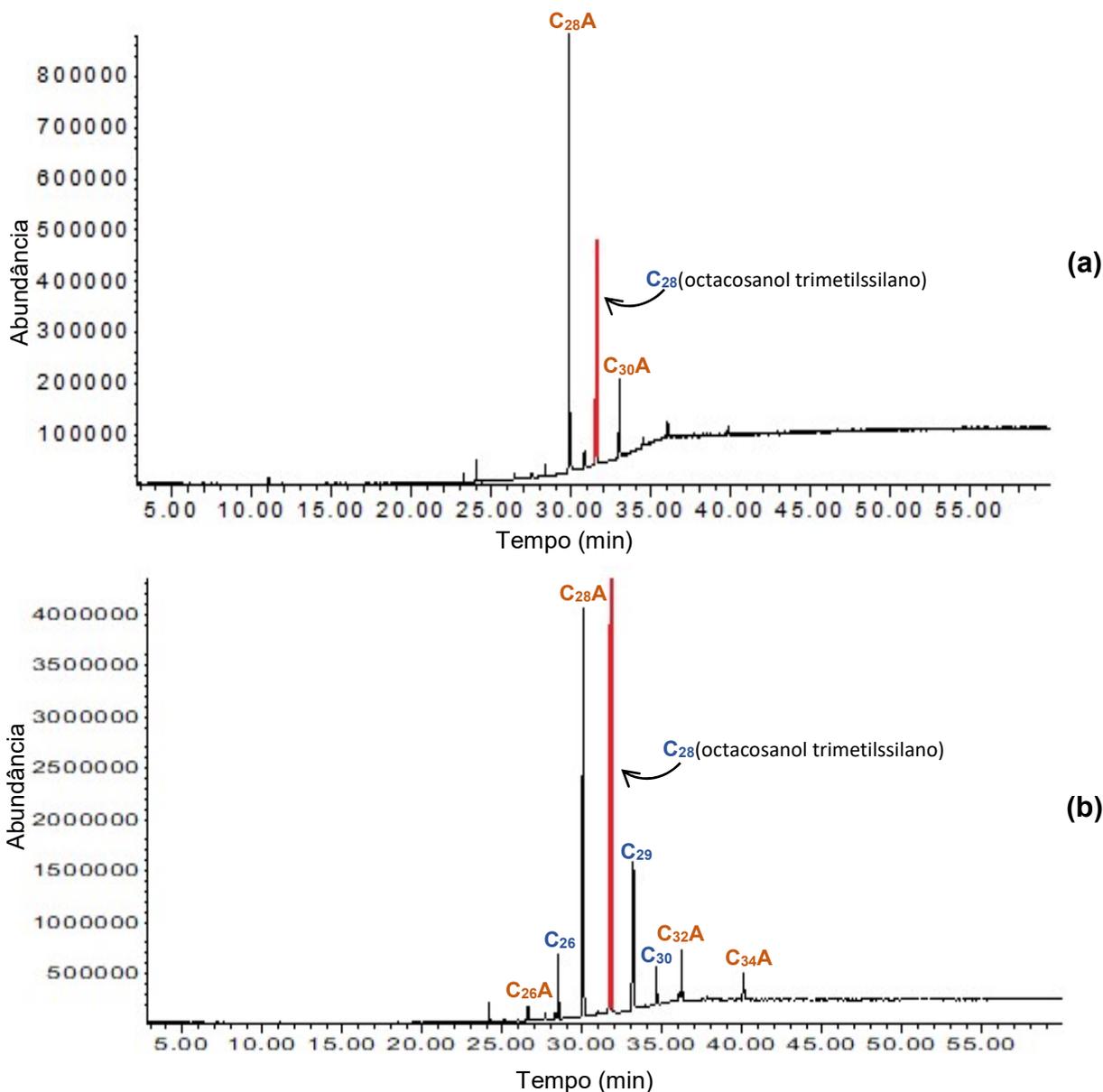
Nota: n.i. (analito não identificado)

4.4.3 Análise da composição das ceras bruta e purificada

Os cromatogramas representativos das análises das ceras bruta e purificada são apresentados na Figura 4.17. A partir da comparação entre os tempos de retenção dos compostos presentes nas ceras foi possível identificar a presença de derivados sililados de álcoois graxos, além de outros constituintes.

Na amostra cera purificada são encontrados analitos ($t_{R's}$ de 28,502, 31,734, 33,184 e 34,635 min) com um fragmento de massa 73, referente ao grupo trimetilsilil $[Si(CH_3)_3]$ e íon molecular mais abundante de 439, 467, 481 e 495 m/z respectivamente. Estes analitos são correspondentes aos álcoois graxos hexacosanol (C_{26}), octacosanol (C_{28}), nonacosanol (C_{29}) e triacotanol (C_{30}). Para os 4 analitos, adicionando-se mais 15 unidades de massa (um radical CH_3) aos íons moleculares mais abundantes, são obtidas as massas moleculares dos álcoois graxos sililados, sendo de 454, 482, 496 e 510 u.m.a. para o hexacosanol, octacosanol, nonacosanol e triacotanol, respectivamente.

Figura 4.17 - Cromatogramas das ceras (a) bruta e (b) purificada sililadas



Legenda: C₂₆A (hexacosanal), C₂₆ (hexacosanol), C₂₈A (octacosanal), C₂₈ (octacosanol), C₃₀A (triacontanal), C₂₉ (nonacosanol), C₃₀ (triacontanol), C₃₂A (dotriacontanal) e C₃₄A (tetratriacontanal)

Como exemplificação, na Figura 4.18a está apresentado o espectro de massas do octacosanol sililado (MM 482 u.m.a.), com íon molecular mais abundante de 467 m/z (perda de um grupo CH₃). Uma análise comparativa entre o espectro de massas do octacosanol sililado e do octacosanol pode ser feita a partir da Figura 4.18b.

Os espectros de massas dos demais analitos encontrados nas ceras brutas e purificada são apresentados no Apêndice D (Figura A4 a A13), enquanto informações acerca da identificação dos mesmos, fórmulas moleculares, tempos de retenção e composição percentual são apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9. As composições dos

constituintes das ceras foram estimadas com base na porcentagem relativa da área de cada pico, de modo que as áreas dos picos totais fossem iguais a 100%.

Figura 4.18 - Espectro de massas do (a) octacosanol sililado (MM 482) e (b) octacosanol (MM 410) (NIST-11)

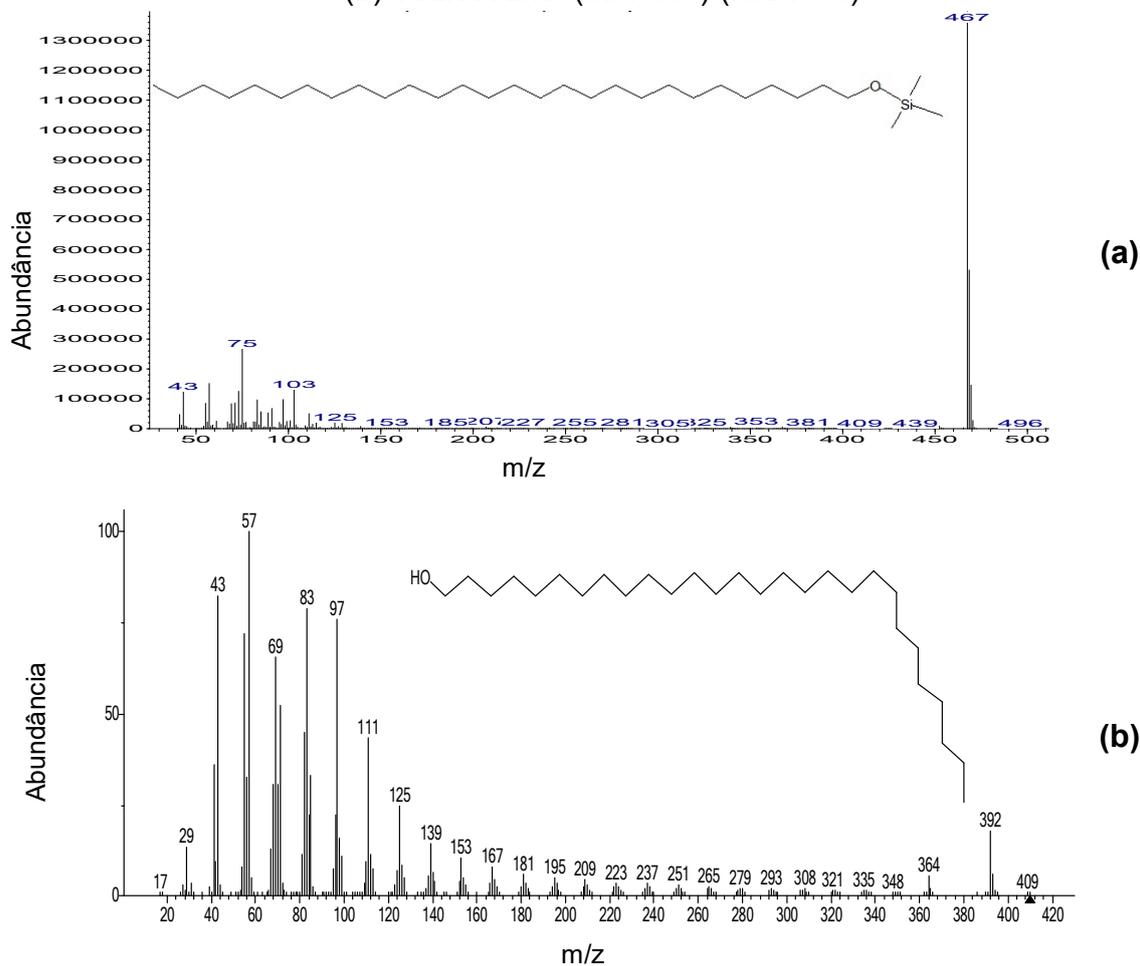


Tabela 4.8 - Analitos presentes na cera bruta sililada

t_R (min)	Identificação	% Relativa	Fórmula Molecular	MM (u.m.a.)
24,061	n.i.	2,45	-	-
29,857	Octacosanal	52,24	$C_{28}H_{56}O$	408
30,818	n.i.	3,17	-	-
31,524	Octacosanol trimetilssilano	27,85	$C_{28}H_{57}OSi(CH_3)_3$	482
33,006	Triacontanal	12,03	$C_{30}H_{60}O$	436
36,028	n.i.	2,27	-	-

Nota: n.i. (analito não identificado)

A cera bruta é composta majoritariamente por aldeídos (64,27%), álcoois graxos (27,85%), além de outros constituintes não identificados (7,89%). Estes mesmos constituintes foram observados na cera purificada, com porcentagem de

álcoois, aldeídos e analitos não identificados, com valores de 51,59, 40,20 e 8,21%, respectivamente; evidenciando que o processo de purificação empregado foi muito útil para promover um maior enriquecimento de álcoois graxos na amostra.

Tabela 4.9 - Analitos presentes na cera purificada sililada

t_R (min)	Identificação	% Relativa	Fórmula Molecular	MM (u.m.a.)
24,188	n.i.	1,11	-	-
26,593	Hexacosanal	0,78	$C_{26}H_{52}O$	380
28,502	Hexacosanol trimetilssilano	3,76	$C_{26}H_{53}OSi(CH_3)_3$	454
30,054	Octacosanal	33,05	$C_{28}H_{56}O$	408
31,734	Octacosanol trimetilssilano	36,03	$C_{28}H_{57}OSi(CH_3)_3$	482
33,127	n.i.	6,35	-	-
33,184	Nonacosanol trimetilssilano	9,50	$C_{29}H_{59}OSi(CH_3)_3$	496
34,635	Triacontanol trimetilssilano	2,30	$C_{30}H_{61}OSi(CH_3)_3$	510
36,060	n.i.	0,75	-	-
36,219	Dotriacontanol	3,73	$C_{32}H_{64}O$	464
40,081	Tetratriacontanal	2,64	$C_{34}H_{68}O$	492

Nota: n.i. (analito não identificado)

Assim como foi observado por outros autores (Laguna-Granja et al., 1999; Irmak et al., 2006; Mendez et al., 2008; Asikin et al., 2008 e 2012; Weerawatanakorn et al., 2016 e 2019), o octacosanol também foi o componente majoritário encontrado na amostra de cera purificada da cana-de-açúcar, representando 69,84% dentre todos os álcoois graxos existentes (Tabela 4.9). No trabalho desenvolvido por Oliveira (2018), a cera metilada da casca da cana-de-açúcar extraída com hexano, limoneno e terebentina, apresentou teor de octacosanol variando de 22,2 a 31,3%, 17,8 a 27,8% e 18,1 a 21,1%, respectivamente.

Além dos derivados sililados dos álcoois graxos (C_{26} , C_{28} , C_{29} e C_{30}), nas Tabelas 4.8 e 4.9 observa-se também a presença de aldeídos (C_{26} , C_{28} , C_{30} , C_{32} e C_{34}). Nos aldeídos de cadeia linear, alguns picos do íon molecular podem ser utilizados como evidência para a identificação do perfil de fragmentação da amostra, ocorrendo a M-18 (perda de água), M-28 (perda de etileno), M-43 (perda de $CH_2=CH-O$) e M-44 (perda de $CH_2=CH-OH$) (Skooge et al., 2002; Silverstein et al., 2005; Vieira et al., 2012).

Os aldeídos têm padrão de fragmentação semelhante para os fragmentos de menor massa molar e, no caso da cera da cana-de-açúcar, é caracterizado pela perda

de uma molécula de H₂O (18 u.m.a.), conforme exemplificado nas Figuras 4.19 e 4.20, a partir do espectro de massas do dotriacontanal (C₃₂), com massa molecular igual a 464 u.m.a.

Figura 4.19 - Padrão de fragmentação comum aos aldeídos

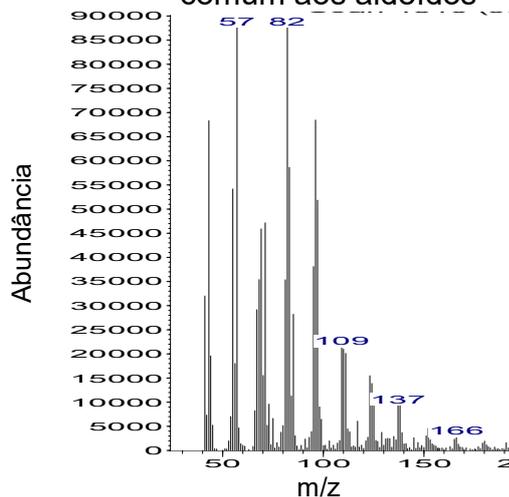
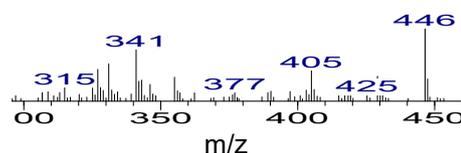
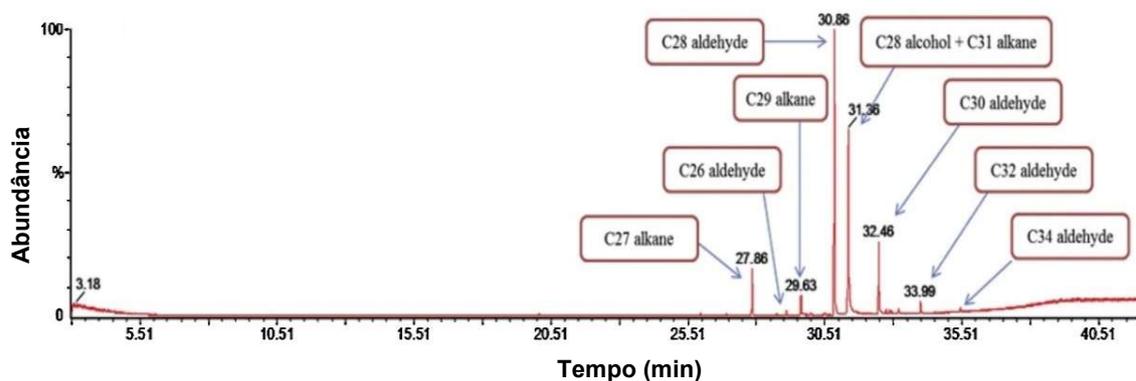


Figura 4.20 - Padrão de fragmentação do dotriacontanal (MM 464) com perda de uma molécula de H₂O (m/z 446)



Perfis de fragmentações semelhantes de álcoois e aldeídos de cadeia longa foram identificados em estudos anteriores (Irmak et al., 2006; Asikin et al., 2008 e 2012; Attard et al., 2015). Os dados apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9 corroboram com os resultados encontrados por Attard et al. (2015) que observaram que a casca da cana-de-açúcar era composta majoritariamente por aldeídos e álcoois de cadeia longa com teores de 56 e 27%, respectivamente. O cromatograma obtido pelo referido autor está apresentado na Figura 4.21, para fins ilustrativos. Vale salientar que não foi possível observar as mesmas classes de componentes, como ácidos graxos (C₆ - C₃₀) e ésteres de cadeia longa (C₃₈ - C₅₈), uma vez que Attard et al. (2015) utilizou coluna específica para altas temperaturas (HT-GC de 360-380 °C).

Além do octacosanol (C₂₈H₅₈O), o aldeído de cadeia longa octacosanal (C₂₈H₅₆O), também apresenta efeitos benéficos na promoção da saúde, principalmente como agente na prevenção e tratamento de osteoporose (Chinen, 2006), podendo ser utilizado de forma segura e eficaz na administração de bebidas e suplementos.

Figura 4.21 - Cromatograma da cera da cana-de-açúcar sililada de referência

Fonte: Attard et al. (2015)

A quantificação do octacosanol foi realizada por CG-MS a partir da construção de uma curva de calibração com padrão externo, comparando-se o seu tempo de retenção com o do padrão autêntico de octacosanol. Realizada a curva de calibração, foi observado que as ceras bruta e purificada apresentavam teor 9,69% e 29,74%, o que corresponde a 96,92 e 297,39 mg de octacosanol.g⁻¹ de cera e; 628,03 e 1175,15 mg de octacosanol.100g⁻¹ de casca da cana-de-açúcar, respectivamente. Os cálculos foram realizados considerando os rendimentos de cera bruta em relação a casca e da etapa de purificação da cera bruta, com valores 6,48% e 60,98%, respectivamente, conforme apresentado no item 4.2 deste capítulo.

Os resultados obtidos com a realização deste estudo corroboram com os observados por outros autores ao analisarem a cera de diferentes resíduos da cana-de-açúcar, com valor de policosanol variando de 1,7 a 27,0 mg.100g⁻¹ (Irmak et al., 2006); 8,5 a 33,0 mg.100g⁻¹ (Del Río et al., 2015); 6,7 a 85,7 mg.100g⁻¹ (Asikin et al., 2008); 2,0 a 141,5 mg.100g⁻¹ (Weerawatanakorn et al., 2016 e 2017); 61,4 a 220,8 mg.100g⁻¹ (Attard et al., 2015) e 150 a 500 mg.100g⁻¹ de biomassa (Asikin et al., 2012). O teor de octacosanol obtido por alguns destes autores também foi indicado, sendo de 2,97 mg.100g⁻¹ (Ou et al., 2012); 4,80 a 19,40 mg.100g⁻¹ (Del Río et al., 2015); 3,82 a 65,99 mg.100g⁻¹ (Asikin et al., 2008); e 0,14 a 46,04 mg.100g⁻¹ (Weerawatanakorn et al., 2016 e 2017).

Capítulo 5

REAÇÕES DE CLIVAGEM DOS ÉSTERES

Como as ceras naturais são compostas majoritariamente por ésteres, ácidos e álcoois graxos livres e esterificados, para se obter uma amostra concentrada em policosanol, faz-se necessária a clivagem dos ésteres da cera purificada. Diante disto, neste capítulo são apresentadas as diferentes metodologias de clivagem dos ésteres (saponificação e transesterificação) empregadas (Tabela 5.1), visando a obtenção de elevados teores de octacosanol.

Tabela 5.1 - Resultados obtidos das reações de clivagem dos ésteres da cera purificada

Método	Referência do método	Rendimento de policosanol (%)	Teor de octacosanol (%)	Octacosanol contido na cera purificada (mg.g ⁻¹)	Octacosanol contido na casca (mg.100 g ⁻¹)
Transesterificação alcalina	Laguna-Granja et al. (1997 e 1999)	53,27	22,58	120,29	475,34
	Irmak et al. (2006)	4,83	8,82	4,32	17,06
	Wang et al. (2007)	2,39	47,50	11,35	44,86
Transesterificação ácida	Liang et al. (2017)	2,55 ^a - 3,62 ^b	22,90 ^a - 32,41 ^b	8,25 ^a - 8,29 ^b	32,61 ^a - 32,76 ^b
	Jesus et al. (2019)	11,43	11,28	12,89	50,93
Saponificação	Ramos-Zambrano et al. (2019)	21,42	14,96	32,03	126,58

Nota:^aextração com hexano

^bextração com clorofórmio

Os teores de octacosanol apresentados na Tabela 5.1 são compatíveis com os dados de clivagem de ésteres de ceras do farelo de arroz, abelha e cochonilha (*Dactylopius coccus*) cujos teores totais de policosanol variaram de 9,8 - 10,8% (Ishaka et al., 2014), 13,2 - 13,9% (Srisaipet et al., 2017), 14,6% (Srisaipet et al., 2016), 18,1 - 28,0% (Wang et al., 2007) e 2,0 - 47,0% (Ramos-Zambrano et al., 2019).

Embora todas as reações tenham sido realizadas com a cera purificada, nota-se que o teor de octacosanol presente no produto da reação de algumas destas amostras foi inferior ao teor contido na amostra de partida (29,74%). Provavelmente a observância de menores teores de octacosanol, nas reações de transesterificação alcalina, deu-se em decorrência da dificuldade de separação desse álcool graxo visto a grande quantidade de sabão gerada (Figura 5.1) ou da ocorrência reações paralelas, contribuindo assim com a redução de seu teor.

A transesterificação catalisada por álcalis apresenta grande vantagem frente a catalisada por ácidos principalmente em decorrência das altas taxas de conversão e velocidade de reação. Entretanto, a realização da reação de transesterificação utilizando catalisadores alcalinos, com materiais contendo teores de AGL superiores a 0,5%, pode resultar na reação paralela de saponificação dos ácidos graxos livres e, conseqüentemente, na redução do rendimento da reação e em dificuldades na separação e purificação do material de interesse (Loterio et al., 2005; Miao et al., 2009; Ehimen et al., 2010), conforme apresentado na Figura 5.1.

Figura 5.1 - Produto da reação de transesterificação alcalina



O teor de ácidos graxos livres (AGL) da cera purificada da cana-de-açúcar foi de $8,7 \pm 0,6\%$, valor este muito superior ao recomendado ($<0,5\%$) para evitar a reação parcial de saponificação da amostra (Miao et al., 2009; Ehimen et al., 2010), justificando o uso do catalizador ácido na reação de transesterificação, uma vez que o desempenho destas reações não é fortemente afetado pela presença de AGLs e possibilita conduzir simultaneamente as reações de esterificação e transesterificação (Goff et al., 2004; Loterio et al., 2005). Entretanto, o teor de octacosanol observado com o emprego da transesterificação catalisada por ácido, conforme proposto Jesus et al. (2019) (11,28%), também foi inferior ao teor do material de partida, sugerindo a ocorrência de possíveis reações paralelas também nesta reação.

Embora seja considerado um catalisador muito promissor na transesterificação de diferentes matérias-primas, principalmente por sua alta atividade e baixo custo (Sebastian et al., 2016), o uso do ácido sulfúrico está associado a alguns inconvenientes (Marchetti e Errazu, 2008; Brinks et al., 2013), uma vez que pode promover não só a esterificação, mas também reações colaterais como oxidação e formação de metil sulfatos e éter dimetílico (Keyes, 1932; Suwannakarn et al., 2009;

Pisarello et al., 2010). A obtenção de álcoois graxos também pode ter sido prejudicada pela presença de água no meio reacional, uma vez que esta favorece a ocorrência de possíveis reações secundária de hidrólise do éster formado que, conseqüentemente, leva à formação de ácidos carboxílicos, fazendo com que esta reação competitiva reduza significativamente o rendimento em álcoois (Lee et al., 2009; Leca et al., 2010).

Devido à complexidade destas matrizes que requerem o uso de ferramentas analíticas como a Cromatografia Gasosa de Alta Temperatura Acoplada a Espectrometria de Massas (HT-GC-MS) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS) com detectores específicos (Řezanka e Sigler, 2006; Del Río et al., 2015; Attard et al., 2015), não foi possível verificar a possível formação de coprodutos nestas reações.

Apesar destas metodologias de clivagem de ésteres terem sido exaustivamente empregadas por muitos pesquisadores, até este momento a eficiência das mesmas não havia sido comparada. Deste modo, dentre as metodologias avaliadas, a transesterificação alcalina proposta por Wang et al. (2007) foi a que forneceu o maior teor de octacosanol (47,50%), provavelmente em decorrência da realização de sucessivas filtrações a quente (com etanol e acetona). Como os álcoois graxos apresentam uma alta temperatura de fusão, sendo sólidos a temperatura ambiente, o aumento da temperatura permitiu uma maior solubilização do álcool graxo e migração para o filtrado.

Os ensaios de clivagem visaram obter frações concentradas de álcoois graxos policosanol (octacosanol) para serem conduzidas as etapas subsequentes deste trabalho com uma amostra mais enriquecida e, na sequência, estender o procedimento para uma amostra mais bruta. Entretanto, os métodos avaliados não foram capazes de aliar elevados rendimentos de policosanol e teor de octacosanol. Considerando que mesmo a amostra enriquecida em octacosanol apresentou problemas de solubilização, optou-se por conduzir as etapas subsequentes deste trabalho com a amostra de cera purificada que apresenta teor de octacosanol de 29,74%.

Capítulo 6

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE SOLVENTES PARA PARTIÇÃO LÍQUIDO-
LÍQUIDO DA CERA PURIFICADA

Ensaio preliminares de partição líquido-líquido foram realizados com sistemas de solventes de diferentes polaridades visando avaliar a aplicabilidade do fracionamento dos componentes da cera purificada de cana-de-açúcar por cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC). Os sistemas de solventes avaliados são apresentados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 - Teste de partição líquido-líquido

Identificação	Sistema bifásico de solventes	Proporção	Proporção de amostra	
			F. sup.	F. inf.
E1*	Hex:ACN:EtOH:H ₂ O	(10:3:4:0)		
E2	Hex:ACN:EtOH:H ₂ O	(10:4:4:0)	++**	+
E3	Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O	(1:1:1:1)	++	+
E4	Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O	(7:1:7:1)	++++	+++
E5	Hex:AcOEt:MeOH:H ₂ O	(7:1:7:1)	++++++	++
E6*	Hex:AcOEt:BuOH:H ₂ O	(7:1:7:1)		
E7*	Hex:CHCl ₃ :EtOH:H ₂ O	(5:2:5:2)		
E8*	Hex:AcOEt:EtOH:H ₂ O	(19:1:19:1)		
E9	Hex:AcOEt:MeOH:H ₂ O	(19:1:19:1)	+++	+
E10	Hex:ACN	(1:1)	++	+

Nota: *Não houve separação de fases ou ficou turvo na fase inferior (E7);

**onde “+” representa a proporção de amostra observada em cada fase através da análise por CCD;

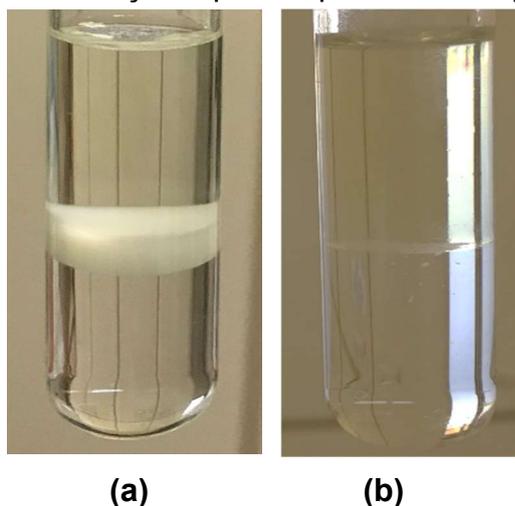
Legenda: Hex: hexano; ACN: acetonitrila; AcOEt: acetato de etila; CHCl₃: clorofórmio; MeOH: metanol; EtOH: etanol; BuOH: butanol; H₂O: água; F. sup.: fase superior; F. inf.: fase inferior.

A distribuição dos componentes da cera entre as fases de cada sistema de solvente foi estimada por cromatografia em camada delgada (CCD). Paralelamente, também foi avaliada a quantidade de amostra contida em cada fase e, se as mesmas apresentavam uma proporção que viabilizasse a reação de silição e identificação do octacosanol por CG-EM. Para aqueles sistemas de solventes em que a concentração dos solutos em ambas as fases era mais equivalente, foi determinado o coeficiente de distribuição (K_D) por CG-EM a partir da razão entre as áreas dos picos da fase superior e inferior. Não foi possível realizar a etapa de partição de alguns sistemas avaliados uma vez que não houve separação de fases, já que alguns sistemas são muito sensíveis à alteração de temperatura, especialmente aqueles contendo acetonitrila.

Dentre os sistemas de solventes bifásicos avaliados, o que possibilitou uma extração mais equivalente da amostra em ambas as fases foram os sistemas E4 e E5, formados por hexano:acetato de etila:etanol:água (7:1:7:1, v/v/v/v) e hexano:acetato de etila:metanol:água (7:1:7:1, v/v/v/v), respectivamente. Nestes sistemas foram observados teores de octacosanol de 2,25% e 1,85% e de 5,62% e 0,70% nas fases superior e inferior e; os valores de coeficiente de distribuição (K_D) obtidos para os sistemas de misturas de solventes E4 e E5 foi de 1,29 e 20,77, respectivamente.

Embora tivesse sido encontrado um sistema de solvente (E4) que possibilitasse uma distribuição mais equivalente do analito de interesse em ambas as fases, mesmo que com baixos teores de octacosanol e, possibilitasse a condução dos ensaios de HSCCC, foi observada a existência de uma interface persistente neste e em todos os demais sistemas de solvente avaliados (Figura 6.1a).

Figura 6.1 - Partição líquido-líquido da cera purificada



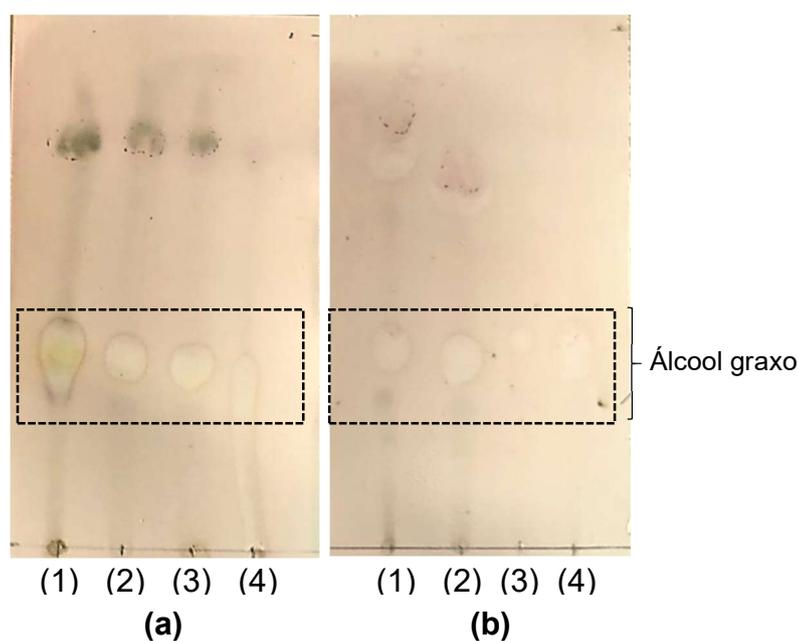
Legenda: Partição da cera purificada no sistema E4 (a) antes e (b) após aquecimento

Na tentativa de contornar o problema da interface, alíquotas das fases superior e inferior foram removidas, concentradas e resolubilizadas no mesmo sistema de solvente previamente testado. Entretanto, a interface ainda persistiu.

Também foi realizado o aquecimento da amostra em meio ao sistema de solvente bifásico e desta forma a interface foi eliminada (Figura 6.1b). Entretanto, após análise da massa contida em ambas as fases e do monitoramento das mesmas por CCD, apresentou na Figura 6.2, verificou-se que houve um aumento de material na fase superior e diminuição na fase inferior. O aumento de temperatura permitiu o aumento da energia cinética, favorecendo assim uma maior solubilização das

moléculas de cera e uma maior migração do material para a fase orgânica (superior). Embora o problema de solubilidade aparentemente tivesse sido contornado a partir do aquecimento, os álcoois graxos contidos nas frações obtidas a partir da HSCCC ainda necessitariam ser convertidos a derivados siliados para serem analisados por CG-EM. Logo, não seria conveniente trabalhar com pouca quantidade de amostra, como o que foi encontrado na fase inferior do sistema.

Figura 6.2 - Análise por CCD do teste de partição com o sistema E4 (a) antes e (b) após aquecimento



Legenda: (1) amostra de referência (cera purificada); (2) fase superior; (3) fase inferior; (4) mistura de álcoois graxos (Lesstanol®)

Ainda que fosse de conhecimento prévio que a amostra apresentava problemas de solubilidade à temperatura ambiente, os testes foram conduzidos na tentativa de verificar se a utilização de sistemas de solventes bifásicos complexos poderia favorecer a solubilização da mesma. Mas visto a baixa solubilidade da amostra nos sistemas de solventes avaliados, o teste de fracionamento por HSCCC foi inviabilizado. Diante disto, foi dada mais atenção a esta interface, na tentativa de entender do que se tratava a natureza deste material e de como removê-lo. Com a realização de ensaios em paralelo, a ocorrência desta interface inicialmente foi associada à presença de ésteres ou ácidos graxos, uma vez que a partir da análise por CCD foi observada a presença destes constituintes juntamente com os álcoois graxos.

Capítulo 7

COMPLEXAÇÃO COM UREIA E FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNAS

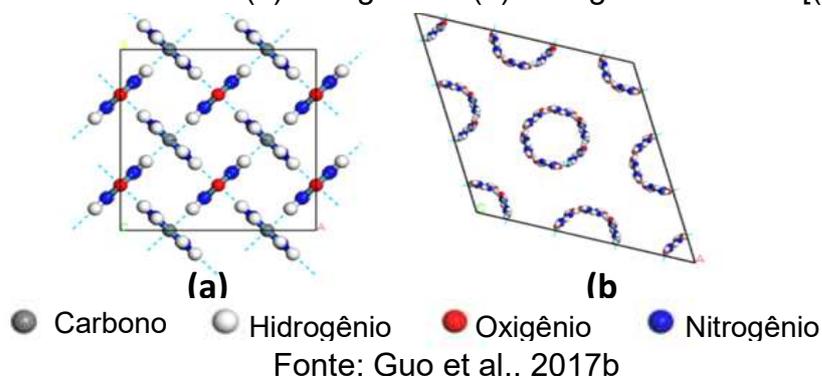
Neste capítulo foi abordada a purificação da cera por cromatografia em coluna (seca e *flash*). É importante salientar que a baixa solubilidade da cera induziu a ser realizado o fracionamento da mesma por coluna cromatográfica de sílica gel, uma vez que esta técnica permitiria avaliar a solubilidade dos compostos majoritários separadamente, de forma rápida, eficiente e de baixo custo.

Entretanto, os resultados revelaram que além da baixa solubilidade dos compostos separados, o objeto da pesquisa, os álcoois graxos, ficaram parcialmente retidos junto aos ácidos graxos na sílica. Neste sentido, uma revisão rápida da literatura, indicou a possibilidade de separar os ácidos graxos da cera através de uma complexação com ureia. A partir do produto desta reação de complexação, caso fornecesse um bom rendimento, teríamos uma amostra enriquecida em ésteres e álcoois graxos para posteriores ensaios. Com isso, este capítulo aborda inicialmente a complexação com ureia e posteriormente as técnicas cromatográficas em sílica gel.

7.1 Remoção de ácidos graxos por complexação com ureia

A ureia possui uma estrutura cristalina tetragonal de cadeia linear (Figura 7.1a), e quando a mesma se cristaliza na presença de ácidos graxos de cadeias alifáticas, são formados complexos que apresentam estrutura cristalina de forma hexagonal (Figura 7.1b) (Hayes et al., 1998; Guo et al., 2017b).

Figura 7.1 - Estrutura cristalina (a) tetragonal e (b) hexagonal da ureia $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$

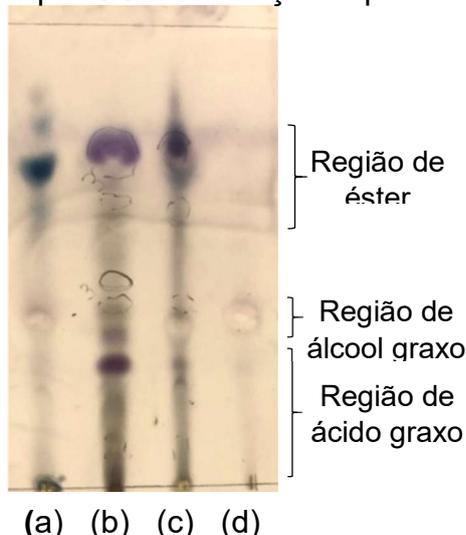


Os dutos formados pelos cristais hexagonais são grandes o suficiente para acomodar cadeias alifáticas (Shahidi e Wanasundara, 1998); porém, esses canais não

conseguem acomodar cadeias carbônicas que contenham insaturações, devido ao maior volume ocupado pelas suas insaturações (Harris, 1996; Shahidi e Wanasundara, 1998), fazendo com que estes sejam facilmente aduzidos.

Dada a natureza do álcool graxo, esperava-se que o mesmo migrasse para a fração não complexada (filtrado), mas de acordo com o monitoramento por CCD (Figura 7.2), isto não foi observado e o álcool graxo ficou retido junto ao ácido graxo na fração complexada.

Figura 7.2 - Análise por CCD das frações após complexação com ureia



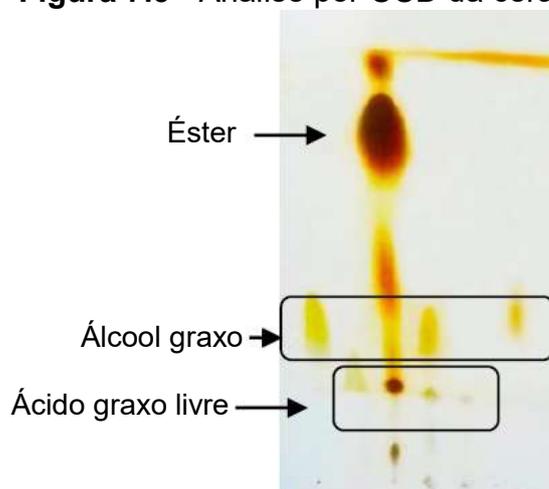
Legenda: (a) amostra de referência (cera purificada); (b) extrato obtido a partir do filtrado (não complexado); (c) extrato obtido a partir do complexo com ureia; (d) mistura de álcoois graxos (Lesstanol®).

A partir da análise por CCD observa-se a presença de álcool graxo na fração correspondente à parte do extrato complexada, enquanto no extrato não complexado são observados componentes de mesmo coeficiente de retenção. Dependendo das quantidades relativas de ureia e ácidos graxos livres, outros complexos podem se formar no filtrado (Hayes et al., 1998), mas não foram realizados ensaios adicionais visando a remoção destes. Vale salientar que a partir dos ensaios complexação por ureia foram identificados os ácidos graxos complexados e não os ácidos graxos livres. Para a obtenção dos ácidos graxos em sua forma livre seria necessário adicionar uma nova etapa de adição de água e acidificação com HCl (Ratnayake, et al., 1988; Wanasundara e Shahidi, 1999), o que não era o foco deste trabalho.

A região imediatamente abaixo dos álcoois graxos, presente tanto na fase complexada quanto na não complexada, é característica dos ácidos graxos e pode ser confirmada a partir da comparação da análise de CCD realizada por Srisaipet et

al. (2016), sendo observado perfis semelhantes dos constituintes da cera de abelha (Figura 7.3) a partir da do uso do eluente hexano:acetato de etila:ácido acético (90:9:1, v/v/v), com revelação por vapor de iodo.

Figura 7.3 - Análise por CCD da cera de abelha



Fonte: Srisaipet et al. (2016)

Além dos ácidos graxos, o complexo de ureia reteve também os álcoois graxos e, para removê-los, foi necessária realizar extração com água e hexano. Alguns autores relataram dificuldades para remover todos os ácidos graxos saturados encontrado em lipídios, sendo em alguns casos impossível, uma vez que alguns ácidos graxos saturados de cadeia mais curta não complexam com a ureia durante o processo de cristalização (Ratnayake, et al. 1988; Shahidi e Wanasundara, 1998). Diante disto, as análises de CG-EM foram realizadas apenas para o extrato obtido a partir da extração da amostra complexada.

O primeiro ensaio de complexação foi baseado no estudo de Schröder e Vetter (2013), que utilizaram razão de amostra:ureia:álcool (1:6:20, m/m/v), identificada como U1. O rendimento do fracionamento do ensaio U1 foi de 3,46%, com teor e rendimento de octacosanol de 6,9% e 2,38 mg.g⁻¹, respectivamente. O produto da complexação com proporção de amostra:ureia:álcool (1:3:40, m/m/v) (Ratnayake, et al. 1988) identificado como U2, apresentou rendimento de reação de 4,57% e, com teor e rendimento de octacosanol de 26,38% e 12,02 mg.g⁻¹, respectivamente. Este valor foi inferior ao da própria cera purificada (29,74%), indicando a inviabilidade da complexação com ureia para a obtenção de uma fração enriquecida em octacosanol.

7.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNAS

Considerando os baixos rendimentos de vários métodos anteriores avaliados, como também, a observação de que os álcoois graxos ficavam retido junto aos ácidos graxos, foi avaliada a purificação do policosanol a partir do fracionamento da cera por coluna, sendo apresentado neste tópico os resultados obtidos a partir do emprego de coluna seca com membrana de acetato de celulose e de coluna *flash* impregnada com KOH.

7.2.1 Coluna seca

Para o fracionamento de cera purificada, foi empregado o método de fracionamento por coluna seca (CS), sendo este capaz de propiciar a separação rápida e satisfatória dos seus componentes em 7 frações, conforme observado na Figura 7.4.

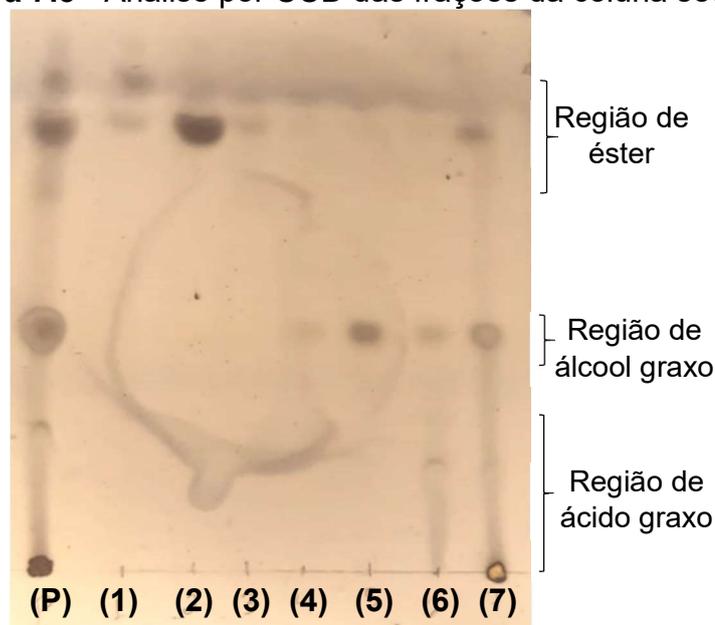


A partir do monitoramento por CCD, foi identificada a presença de álcoois graxos ($R_f=0,38$) em 4 frações (F4, F5, F6 e F7), conforme apresentado na Figura 7.5, onde “P” é a amostra de referência (cera purificada). Vale salientar que na fração F5 foi encontrado álcool graxo com maior abundância, e não foi detectada a partir da CCD a presença de ácidos graxos ($R_f=0,19$) ou ésteres ($R_f=0,72$).

As frações F1, F2 e F3 foram mais ricas em componentes apolares (ésteres), e apresentaram rendimento de fracionamento de 2,1, 5,3 e 1,8%, respectivamente. Nas frações F6 e F7 foram eluídos componentes mais polares, sendo possível observar a presença de ácidos graxos; estando de acordo com a literatura (Srisaipet e Aopkham, 2015; Srisaipet et al., 2016, 2017 e 2019). A fração F7, ou seja, a amostra residual, ainda continha componentes apolares, além de álcoois e ácidos graxos que puderam ser removidos parcialmente na filtração juntamente com componentes mais polares, sendo que estes componentes permaneceram depositados no ponto de aplicação das amostras no CCD. Ainda com relação a fração

F7, a remoção dos constituintes foi parcial em função do entupimento no processo de filtração que pode ser atribuído à presença de $8,7 \pm 0,6\%$ de ácidos graxos livres (AGL) na amostra, determinado de acordo com o método AOCS Ca 5a-40 (2004).

Figura 7.5 - Análise por CCD das frações da coluna seca



Legenda: (P) amostra de referência (cera purificada); (1), (2), (3), (4), (5), (6) e (7), correspondem às frações F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F7, respectivamente.

Os teores de octacosanol sililado encontrados em cada uma das frações contendo álcoois graxos são apresentados na Tabela 7.1. De posse destes valores verifica-se que o emprego da coluna seca foi muito eficaz para promover o fracionamento da cera purificada da cana-de-açúcar, à medida que possibilitou a obtenção de frações enriquecidas em octacosanol com teor de 44% (F5).

Tabela 7.1 - Teores de octacosanol sililado contidos nas frações da coluna seca por CG-EM

Amostra	Rendimento (%)	Teor de octacosanol (%)	Octacosanol contido na cera purificada (mg.g ⁻¹)	Octacosanol contido na casca (mg.100 g ⁻¹)
Fração 4	1,14	23,97	2,73	10,77
Fração 5	1,85	44,00	8,14	32,15
Fração 6	3,11	10,78	3,35	13,23
Fração 7	3,80	14,26	5,42	21,40

O rendimento global do procedimento de fracionamento foi de 19,23%. Ainda que tenha apresentado um rendimento relativamente baixo, o emprego da técnica de cromatografia por coluna seca provou ser extremamente útil na separação dos

componentes da cera da cana-de-açúcar, possibilitando se obter frações concentradas de octacosanol de forma rápida, visual e barata.

De posse da fração concentrada em octacosanol (F5), foi realizado novo teste de extração no sistema bifásico previamente escolhido como a melhor condição (E4) (hexano: acetato de etila: etanol:água, 7:1:7:1, v/v/v/v), conforme apresentado no capítulo 6, na tentativa de contornar o problema de solubilidade previamente encontrado. Entretanto, ainda foi observada a formação de interface. A partir deste ensaio pode-se constatar que a interface formada não se dava em decorrência da presença de ácidos graxos ou outros constituintes da cera, e sim devido a limitação de solubilidade intrínseca a amostra. Diante da não solubilização da amostra enriquecida em octacosanol no sistema de solvente bifásico analisado, optou-se por não dar continuidade aos ensaios de cromatografia contracorrente, já que a inserção de amostras insolúveis poderia levar à sua retenção dentro da coluna, ocasionando assim o entupimento da mesma e dano irreversível do equipamento de HSCCC.

Como a obtenção de frações enriquecidas em álcoois graxos a partir da cromatografia em coluna seca de sílica gel apresentou limitações; devido ao baixo rendimento e a retenção parcial da amostra na sílica gel, conforme foi observado através do entupimento no processo de filtração da fração F7 associado à presença de ácidos graxos que também reteve parte do octacosanol, buscou-se por outras técnicas de purificação de produtos naturais que apresentasse um princípio de separação semelhante. Neste sentido foi realizado o fracionamento da cera por cromatografia em coluna *flash*, que também é uma técnica ainda inexplorada para o fracionamento da cera da cana-de-açúcar.

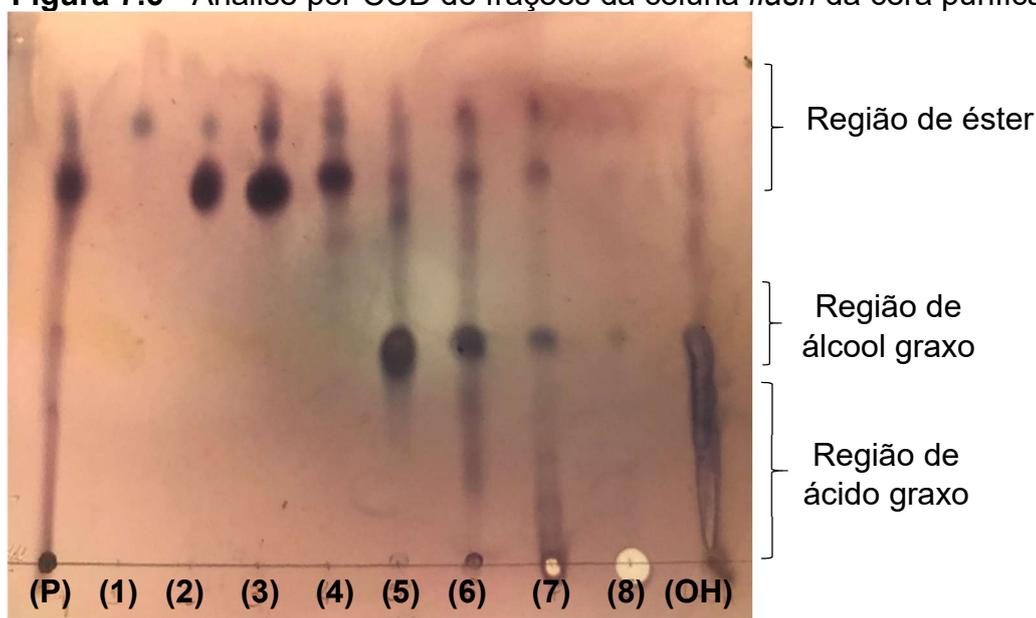
7.2.2 Coluna *flash*

Um levantamento da literatura com foco na separação de ácidos orgânicos indicou o uso de sílica modificada, no caso, sílica gel impregnada com KOH (McCarthy e Duthie, 1962; Ramljak et al., 1977; Braga et al., 1998; Pinto et al., 1997 e 2000; Santos et al., 2020). Segundo Braga et al. (1998) e Pinto et al. (2000), a combinação de coluna cromatográfica *flash*, emprega uma sílica gel de menor granulometria e, o emprego de um adsorvente que retém ácidos orgânicos, no caso, sílica gel impregnada com KOH, permite purificar amostras contendo ácidos orgânicos. Com isso, foi realizado um primeiro ensaio de fracionamento de cera purificada de cana-de-açúcar empregando coluna *flash* e sílica impregnada com KOH, utilizando como

fase móvel hexano (F1 e F2), hexano:clorofórmio (1:1, v/v; F3 e F4), clorofórmio (F5 e F6) e metanol (F7 e F8).

Após análise por cromatografia em camada delgada, observou-se que a técnica cromatográfica, anteriormente empregada no isolamento de ácidos diterpênicos a partir de oleoresina de copaíba (Pinto et al., 2000), conhecida como coluna *flash* em sílica impregnada com KOH, possibilitou fracionar a cera purificada em frações contendo ésteres (F1, F2, F3 e F4 - $R_f = 0,75$), álcoois (F5, F6 e F7 - $R_f = 0,41$) e ácidos graxos (F6, F7 e F8 - $R_f = 0,20$), conforme observado na Figura 7.6.

Figura 7.6 - Análise por CCD de frações da coluna *flash* da cera purificada



Legenda: (P) amostra de referência (cera purificada); (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) e (8), correspondem às frações F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8, respectivamente; e (OH) mistura de álcoois graxos (Lesstanol®)

O comportamento da amostra na coluna de sílica segue o mesmo princípio de separação da placa cromatográfica de CCD. A separação dos compostos químicos ocorre em função de sua compatibilidade com o eluente e da afinidade com a sílica gel. Uma vez que frações menos polares foram removidas com hexano, a polaridade do solvente foi aumentada gradualmente para que mudanças abruptas na polaridade não resultasse em baixa resolução cromatográfica. A utilização de hexano:clorofórmio (1:1, v/v), promoveu a eluição de componentes menos polares similares aos encontrados nas frações F1 e F2. Devido a sua maior afinidade, o uso de clorofórmio como eluente promoveu a separação de frações de álcoois graxos, principalmente nas

frações F5 e F6, que apresentaram massa igual a $170,30 \pm 25,60$ e $52,40 \pm 7,92$ mg, respectivamente.

A partir da utilização de metanol como eluente da coluna *flash*, foram removidas as frações mais polares, como é o caso dos sais de ácidos graxos. De acordo com Santos et al. (2020), o KOH impregnado na sílica *flash* promove a retenção dos ácidos graxos na forma de sais de potássio, sendo necessária etapas de adição de água, além da acidificação com HCl e extração líquido-líquido para se obter de fato uma fração de ácidos graxos livres. Uma vez que o foco deste trabalho é a obtenção de álcoois graxos, não foi realizada a etapa adicional de acidificação dos ácidos graxos presentes na forma de sais de potássio.

Os componentes encontrados nas frações F7 e F8 eram polares a ponto de não serem completamente eluídos e ficarem retidos na origem de aplicação da amostra devido a alta concentração de sais de potássio. Nestas frações ainda foi observada a presença de álcoois graxos, porém com uma concentração bem inferior às obtidas nas frações F5 e F6. Com base na discussão anterior e no resultado da análise por CCD da Figura 7.6 pode-se observar uma excelente separação cromatográfica, cuja eficiência foi avaliada posteriormente.

De posse dos resultados obtidos a partir da CCD, as amostras que apresentaram álcoois graxos (F5, F6 e F7) foram sililadas (MSTFA) e, posteriormente analisadas por CG-EM, conforme apresentado na Tabela 7.2. Embora a fração F8 indicasse a presença de álcoois graxos, não foram realizadas análises quantitativas para esta fração, visto a baixa distribuição de álcoois graxos e alta concentração de componentes polares contidos na mesma.

Tabela 7.2 Teores de octacosanol sililado contido nas frações da coluna *flash* da cera purificada por CG-EM

Amostra	Rendimento (%) [*]	Teor de octacosanol (%)	Octacosanol contido na cera purificada (mg.g ⁻¹)	Octacosanol contido na casca (mg.100 g ⁻¹)
Fração 5	$16,68 \pm 2,21$	$55,66 \pm 4,78$	$92,34 \pm 4,35$	$364,87 \pm 17,20$
Fração 6	$5,15 \pm 0,87$	$29,80 \pm 7,18$	$15,65 \pm 6,29$	$61,83 \pm 24,84$
Fração 7	$27,18 \pm 8,84$	$2,40 \pm 1,08$	$6,04 \pm 0,81$	$23,85 \pm 3,19$

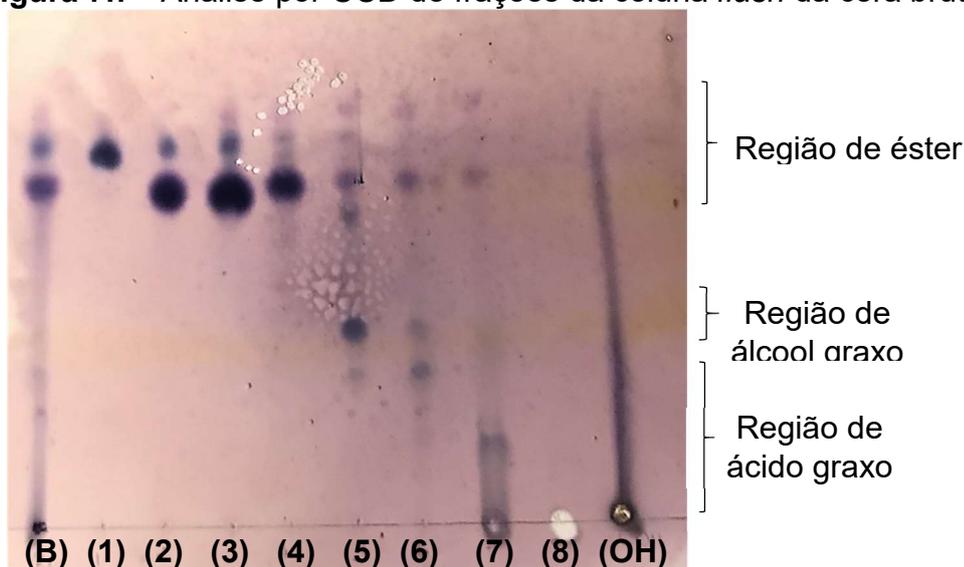
*O rendimento determinado em relação à massa inicial de cera purificada utilizada

As análises de CG-EM confirmaram a maior concentração de álcoois graxos, na fração F5, seguida pela F6 e F7, conforme observado na análise por CCD (Figura

7.6). Ao se comparar as frações mais concentradas de octacosanol obtida a partir da utilização da coluna *flash* (fração F5, Tabela 7.2) em relação a coluna seca (fração F5, Tabela 7.1), observa-se que o emprego da coluna *flash*/KOH possibilitou um aumento de aproximadamente 11% no teor de octacosanol, resultando em um aumento expressivo da concentração de octacosanol contido na casca. A concentração de octacosanol em relação a casca obtida para a fração F5 (364,87 mg.100 g⁻¹) foi muito superior aos resultados encontrados por outros autores na literatura que empregaram diferentes métodos para a obtenção de octacosanol, com valores de 8,4 - 21,9 mg.100 g⁻¹ (Irmak et al., 2006), 52,4 - 100,5 mg.100 g⁻¹ (Asikin et al., 2012), 11,0 - 190,3 mg.100 g⁻¹ (Attard et al., 2015) e 4,8 - 19,4 mg.100 g⁻¹ (Del Río et al., 2015).

Para avaliar a eficiência da técnica de cromatografia em coluna *flash* com sílica impregnada com KOH para o isolamento de octacosanol, também foi realizado um fracionamento da cera bruta empregando as mesmas condições cromatográficas. O perfil químico das frações da cera purificada foram muito parecidos com os da cera bruta, à medida em que apresentou R_f de 0,67, 0,42 e 0,18 para as frações de ésteres, álcoois e sais de ácidos graxos, respectivamente, conforme Figura 7.7.

Figura 7.7 - Análise por CCD de frações da coluna *flash* da cera bruta



Legenda: (B) amostra de referência (cera bruta); (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) e (8), correspondem às frações F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8, respectivamente; e (OH) a mistura de álcoois graxos (Lesstano[®])

Assim como ocorreu para as frações da cera purificada, para a cera bruta foram analisadas por CG-EM apenas as frações F5, F6 e F7, que foram as que indicaram a

presença de álcoois graxos. O resultado destas análises está apresentado na Tabela 7.3, onde é possível observar uma mesma tendência de comportamento da cera purificada, com ligeiro aumento de concentração de octacosanol em relação a casca.

Tabela 7.3 - Teores de octacosanol sililado contido nas frações da coluna *flash* da cera bruta por CG-EM

Amostra	Rendimento (%)	Teor de octacosanol (%)	Octacosanol contido na cera bruta (mg.g ⁻¹)	Octacosanol contido na casca (mg.100 g ⁻¹)
Fração 5	13,43	51,41	69,07	447,55
Fração 6	4,76	33,82	16,09	104,26
Fração 7	17,12	1,50	2,56	16,61

Considerando que, a partir da análise por CG-EM a cera bruta apresentou concentração de octacosanol de 628,03 mg.100 g⁻¹ de casca, o elevado valor de octacosanol (447,55 mg.100 g⁻¹ de casca) obtido na fração F5, proveniente do fracionamento da cera bruta de cana-de-açúcar, pode ser considerado um resultado muito expressivo em relação à eficiência da técnica cromatográfica empregada. É relevante observar que este valor, 447,55 mg.100 g⁻¹, está acima do obtido para a fração F5 proveniente do fracionamento da cera purificada, 364,87 mg.100 g⁻¹ (Tabela 7.2). Lembrando que além de ser um valor mais expressivo, o fracionamento da cera bruta reduz significativamente o custo com etapa de purificação da cera de cana-de-açúcar. Ao se comparar as cromatoplasmas de CCD das frações obtidas a partir da cera purificada e da cera bruta, observa-se que nesta última não foram visualizadas áreas características de álcoois graxos ($R_f = 0,42$) nas frações F7 e F8, como visto nas frações da cera purificada, indicando que a eluição do álcool graxo tenha ocorrido majoritariamente nas frações F5 e F6.

A utilização de cromatografia *flash* e sílica impregnada com KOH se mostrou muito vantajosa para fracionar tanto a cera purificada quanto a bruta, que apresentavam teor de octacosanol inicial de 29,74 e 9,69% e, após fracionamento, foi possível obter frações enriquecidas com 55,66 e 51,51% de octacosanol, respectivamente.

Como a avaliação inicial dos álcoois graxos nas frações foi feita por análise de CCD e era importante se trabalhar com uma amostra mais enriquecida em octacosanol, optou-se por desenvolver a técnica de fracionamento por coluna com a cera purificada. Entretanto, o uso da coluna cromatográfica *flash* com sílica

impregnada com KOH também se mostrou muito satisfatório para conduzir o fracionamento da cera bruta.

Neste sentido esta técnica se mostrou muito vantajosa para avaliar o material de partida e a necessidade de serem conduzidos ensaios prévios de purificação, se apresentando muito viável para promover o enriquecimento de amostras brutas e purificadas em termos do octacosanol, de forma simples e barata. Embora tenham sido observados desvios relativamente altos para algumas frações oriundas da cera purificada, vale salientar que esta técnica alcançou seu objetivo visto que a repetição em triplicata forneceu um valor baixo de desvio para a fração enriquecida em octacosanol (fração F5, Tabela 7.2).

Os resultados obtidos a partir da utilização da técnica de cromatografia *flash* com sílica impregnada com KOH possibilitaram a obtenção de frações com composição comparável à encontrada na mistura comercial de álcoois graxos Lesstanol® de pureza mínima em álcoois graxos (C₂₄ - C₃₂) de 90% (especificação no Apêndice C). As porcentagens relativas dos analitos contidos nas frações provenientes da coluna *flash* e do Lesstanol® estão apresentados na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 - Porcentagens relativas dos constituintes das frações 5 das colunas *flash* com cera purificada e bruta, além da mistura de álcoois graxos (Lesstanol®)

Identificação	Cera purificada	Cera bruta	Lesstanol®
	% Relativa		
Tetracosanol trimetilssilano (C ₂₄)	-	-	1,75
Hexacosanol trimetilssilano (C ₂₆)	6,31	4,94	14,37
Heptacosanol trimetilssilano (C ₂₇)	2,29	2,15	0,96
Octacosanal (C ₂₈)	3,32	5,29	-
Octacosanol trimetilssilano (C ₂₈)	71,37	69,28	60,41
Nonacosanol trimetilssilano (C ₂₉)	-	-	2,26
Triacontanal (C ₃₀)	1,86	2,20	-
Triacantanol trimetilssilano (C ₃₀)	4,27	4,19	17,10
Dotriacantanol trimetilssilano (C ₃₂)	-	-	1,06
n.i.	10,60	11,96	2,11

Nota: n.i. (analito não identificado)

As frações obtidas a partir das colunas *flash* apresentaram porcentagens relativas de octacosanol aproximadamente 10% superior a encontrada na mistura comercial de álcoois graxos, evidenciando a eficiência da técnica desenvolvida neste estudo para a obtenção de frações enriquecidas de octacosanol e a potencialidade do seu emprego para possibilitar a produção nacional de octacosanol.

Como mencionado anteriormente, o uso do policosanol está associado à diversos efeitos benéficos para saúde humana, com destaque para a sua ação anticolesterolêmica. Para a utilização das frações concentradas em policosanol como fármaco, faz-se necessária a análise do perfil toxicológico e efeitos adversos decorrentes da presença de solventes residuais (USP 467, *Residual Solvents*) e impurezas (ICH Q3D, *Guideline for Elemental Impurities*); especialmente porque a obtenção da fração concentrada de policosanol envolve múltiplos passos e estas impurezas podem estar associadas com a pureza do material de partida, condições de processamento, armazenamento e os métodos de isolamento e purificação (Gorog, 2003; Jain e Basniwal, 2013).

No entanto, visto que inicialmente o foco deste trabalho era purificar uma mistura complexa de constituintes (cera da casca da cana-de-açúcar) e isolar frações de policosanol, não foi possível realizar os ensaios de determinação de solventes residuais e impurezas, uma vez que a etapa de fracionamento foi realizada partindo-se de 1,0 g de cera, não sendo obtida quantidade de amostra suficiente para conduzir as referidas análises. De acordo com o orçamento obtido junto a Central Analítica do Instituto de Química (IQ - UNICAMP), seria necessário utilizar quantidade mínima de 5,0 g da fração concentrada de policosanol para a realização de cada ensaio de determinação do solvente residual (USP<467>; valor unitário: R\$ 657,40) e de impurezas (ICH 3QD; valor unitário: R\$ 1.105,08).

De forma geral, considerando os volumes usados de fase móvel e as massas de adsorvente, pode-se concluir que os resultados obtidos a partir do fracionamento da cera por cromatografia em coluna *flash* com sílica gel impregnada com KOH indicaram que esta técnica foi eficaz para promover a separação de frações contendo diferentes constituintes (ésteres, álcoois e sais de ácidos graxos), além de concentrar em policosanol, possibilitando também solucionar a limitação de solubilidade da amostra. O uso desta técnica para o fracionamento da cera da cana-de-açúcar é uma abordagem inédita e com grande potencial de aplicabilidade à medida que permite obter frações enriquecidas em diferentes classes químicas de forma simples, eficiente, rápida e barata, principalmente por não querer o uso de equipamentos de alto valor agregado como ocorre em outros tipos de cromatografia de purificação (ex. CCC, HPLC, cromatografia *flash*, dentre outros).

Capítulo 8 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram avaliadas diferentes abordagens visando a obtenção de frações concentradas do policosanol (octacosanol) presente na cera da cana-de-açúcar, de modo que os resultados alcançados contribuíram significativamente com a ampliação do conhecimento técnico e científico na área de processos de separação para aplicações industriais e analíticas.

Inicialmente, a partir da casca da cana-de-açúcar foi avaliada a obtenção da cera bruta e purificada, com rendimentos de $6,48 \pm 0,31\%$ e $60,98 \pm 0,98\%$, respectivamente. Ambas as ceras foram caracterizadas a partir de suas propriedades físico-químicas, apresentando valores comparáveis com a literatura.

Foram avaliados diferentes métodos de clivagem dos ésteres de cera por meio de reações de transesterificação catalisada por álcali e ácidos e, saponificação. Considerando os baixos teores de octacosanol obtido a partir da realização destas reações, optou-se por dar seguimento no trabalho com a cera purificada, que apresentou teor de octacosanol de 29,74%.

Visando o emprego da cromatografia contracorrente para o fracionamento da cera, foram realizados ensaios preliminares de partição líquido-líquido que indicaram um melhor sistema de solventes (Hex:AcOEt:EtOH:H₂O, 7:1:7:1 v/v/v/v). Entretanto, a baixa solubilidade da cera purificada na quantidade a ser utilizada, inviabilizou a realização do fracionamento por HSCCC, visto que a inserção de amostras insolúveis poderia levar à sua retenção dentro da coluna, ocasionando assim o entupimento da mesma e dano irreversível do equipamento.

Também foi explorada a obtenção de frações concentradas em octacosanol por meio do uso de colunas cromatográficas com sílica gel. A técnica de coluna seca possibilitou obter frações enriquecidas em até 44% de octacosanol, indicando que esta poderia ser uma rota viável para alcançar o objetivo proposto.

Neste sentido foi realizada uma nova abordagem de fracionamento dos constituintes da cera utilizando coluna cromatográfica *flash* com sílica gel impregnada com KOH, que era uma técnica até então inexplorada para este fim. O uso desta técnica permitiu fracionar os dos ésteres, álcoois e sais de ácidos graxos da cera da cana-de-açúcar, apresentando teor de octacosanol superior a 51 e 55%, quando utilizada a cera bruta e purificada, respectivamente. Estas frações apresentaram

porcentagens relativas de octacosanol superior a encontrada na mistura comercial de álcoois graxos (Lesstanol[®]), com valores de 69,28, 71,37 e 60,41% para as frações das ceras bruta, purificada e Lesstanol[®], respectivamente.

Finalmente, com a realização deste estudo pode-se concluir que a obtenção de frações concentradas de álcoois graxos oriundos da cera da cana-de-açúcar foi um grande desafio, principalmente em decorrência da baixa solubilidade da cera, o que impossibilita com que a mesma seja melhor explorada. Ainda assim, considerando todas as limitações, foi possível desenvolver uma técnica capaz de separar frações de diferentes grupos químicos presentes na cera da cana-de-açúcar, com a obtenção de fração enriquecidas de octacosanol. O uso da cromatografia com sílica *flash* impregnada com KOH pode ser considerado um campo com potencial para a realização de estudos futuros de fracionamento de matérias-primas oriundas de ceras vegetais, uma vez que este é um método simples, rápido, de baixo custo, eficiente e reprodutivo.

Capítulo 9

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros propõe-se:

- Avaliar o fracionamento da cera oriunda da torta do filtro a partir do uso de cromatografia em coluna *flash*.
- Avaliar o fracionamento da cera a partir da impregnação da sílica com bases mais fracas, como carbonato de potássio por exemplo.
- Otimizar condições de fracionamento por coluna *flash* a partir do uso de outros adsorventes e/ou solventes, desde que impregnados com KOH ou outras bases.
- Após a obtenção de um produto enriquecido em octacosanol, conduzir análises de solventes residuais e impurezas.
- Realizar a análise econômica do processo de obtenção da fração enriquecida de octacosanol a partir do fracionamento por coluna *flash*.
- Estudar outras alternativas de sistemas bifásicos capazes de solubilizar a cera à temperatura ambiente usando solventes verdes e então fazer o fracionamento por cromatografia contracorrente (HSCCC).
- Avaliar outras técnicas de purificação e análise do policosanol, como por exemplo o emprego da destilação molecular e HPLC-HT.

REFERÊNCIAS

- Adhikari, P., Hwang, K. Y., Park, J. N., Kim, C. K. Policosanol Content and Composition in Perilla Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 5359-5362, 2006.
- Aguilar-Rivera, N. Value Chain of the Diversification of the Sugar Cane Agroindustry in México. *Agroproductividad*, v. 10, n. 11, p. 21-28, 2017.
- Akoh, C. C., Min, D. B. *Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.
- Albuquerque, M. L. S., Guedes, I., Alcantara Jr. P., Moreira S. G. C. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. *Vibrational Spectroscopy*, v. 33, p. 127-131, 2003.
- American Heart Association, Atherosclerosis and cholesterol, 2017. Disponível em: <<https://www.heart.org/en/health-topics/cholesterol/about-cholesterol/atherosclerosis>>. Acesso em: 05 maio 2019.
- ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 06 de agosto de 2010. Dispõe sobre as “Categorias de Alimentos e Embalagens Isentos e com Obrigatoriedade de Registro Sanitário” constante no anexo I desta Resolução. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0027_06_08_2010.html> Acessado em: 04 maio 2021.
- AOCS - American Oil Chemists Society. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society*. 5th ed. Champaign, IL: AOCS Press, 1998.
- Araki, T., Okazawa, T., Kubo, Y., Ando, H., Asai, H. Separation of Lighter Rare Earth Metal Ions by Centrifugal Countercurrent Type Chromatography with Di-(2-ethylhexyl)phosphoric Acid. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 11, p. 267–281, 1998.
- Arruzazabala, M. L., Carbajal, D., Mas, R., Garcia, M., Fraga, V. Effects of Policosanol on platelet aggregation in rats. *Thrombosis Research*, v.69, p. 321-327, 1993.
- Asikin, Y., Chinen, T., Takara, K., Wada, K. Determination of Long-chain Alcohol and Aldehyde Contents in the Non-Centrifuged Cane Sugar Kokuto. *Food Science and Technology Research*, v. 14, n. 6, p. 583-588, 2008.

- Asikin, Y., Takahashi, M., Hirose, N., Hou, D., Takara, K., Wada, K. Wax, policosanol, and long-chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 114, p. 583-591, 2012.
- Athukorala, Y., Mazza, G., Oomah, B. D. Extraction, purification and characterization of wax from flax (*Linum usitatissimum*) straw. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 111, p. 705-714, 2009.
- Attard, T. M., McElroy, C. R., Rezende, C. A., Polikarpov, I., Clark, J. H., Hunt, A. J. Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 95-103, 2015.
- Attard, T. M., McElroy, C. R., Gammons, R. J., Slattery, J. M., Supanchaiyamat, N. Supercritical CO₂ extraction as an effective pretreatment step for wax extraction in a Miscanthus biorefinery. *Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 4, p. 5979–5988, 2016.
- 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.
- Azzam, A. M. Further investigations on cane wax refining and bleaching. *Fette Seifen Anstrichmittel*, v. 88, n. 5, p. 191-194, 1986.
- Balch, R. T. The lipids of sugarcane. In: Honig, P. *Principles de Sugar Technology*. New York: Elsevier Publishing Company, v. 1, cap. 7, p. 196-213, 1953.
- Baldermann, S., Mulyadi, A. N., Yang, Z., Murata, A., Fleischmann, P., Winterhalter, P., Knight, M., Finn, T. M., Watanabe, N. Application of centrifugal precipitation chromatography and high-speed countercurrent chromatography equipped with a spiral tubing support rotor for the isolation and partial characterization of carotenoid cleavagelike enzymes in *Enteromorpha compressa*. *Journal of Separation Science*, v. 34, n.19, p. 2759-2764, 2011.
- Barreto Jr., A. G., Biscaia Jr., E. C., Veiga Jr. V. F., Pinto, A. C., Carvalhaes, S. F., Maciel, M. A. M. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). *Química Nova*. v. 28, n. 4, p. 719-722, 2005.

- Batistella, C. B. Wolf-Maciel, M. R. Modeling, simulation and analysis of molecular distillators: centrifugal and falling film, *Computers & Chemical Engineering*, v. 20: S19-S24, 1996.
- Bernardini, E. Batch and continuous solvent extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 53, n. 6, p. 275-278, 1976.
- Berthod, A. *Chiral recognition in separation methods: mechanisms and applications*. Heidelberg, New York: Springer, 2010.
- Bhosale, P. R., Sonal G. C., Raut, P. D. Studies on Extraction of Sugarcane Wax from Press Mud of Sugar Factories From Kolhapur District, Maharashtra. *Journal of Environmental Research and Development*, v. 6, n. 3, 2012.
- Blau, K., Halket, J. M. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. 2nd ed., London: John Wiley & Sons, 369 p., 1993.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- Braga, F., Rezende, C. M., Antunes, O. A. C., Pinto, A. C. Terpenoids from copaiba cearensis. *Phytochemistry*, v.49, n. 1, p. 263-264, 1998.
- Brinks, J., Malins, K., Kampars, V., Prilucka, J., Apseniece, L. Optimization of rapeseed oil fatty acid esterification with methanol in the presence of sulfuric acid. *Polish Journal of Chemical Technology*, v. 15, n. 4, p. 54-59, 2013. doi: 10.2478/pjct-2013-0068
- Buttar, G. S., Parmar, S. S., Singh, K. An efficacious protocol of wax extraction from filter cake of sugar industry and its chemical analysis. In: 61ST Annual Convention of the Sugar Technologists Association of India, New Delhi, 1999. Proceedings. New Delhi: The Sugar Technologists Association of India, p. 40-44, 1999.
- Byrne, F. P., Jin, S., Paggiola, G., Petchey, T. H. M., Clark, J. H., Farmer, T. J., Hunt, A. J., McElroy, R., Sherwood, J. Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides *Sustainable Chemical Processes*, v. 4, n. 7, 24p., 2016.
- Cao, X., Yang, C., Pei, H., Li, X., Xu, X., Ito, Y. Application of counter-current chromatography as a new pretreatment method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water. *Journal of Separation Science*, v. 35, n. 4, p. 596-601, 2012.

Castaño, G., Mas, R., Fernandez, J., Fernandez, L., Alvarez, E., And Lezcay, M. Efficacy and tolerability of policosanol compared with lovastatin in patients with type II hypercholesterolemia and concomitant coronary risk factors. *Current Therapeutic Research*, v. 61, n. 3, p. 137-146, 2000.

Carbajal, D., Molina, V., Valdes, S., Arruzazabala, L., Mas, R. Anti-ulcer activity of higher primary alcohols of beeswax. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 47, p. 731-733, 1995.

Cebula, D. J., Smith, K. W. Differential scanning calorimetry of confectionery fats. Pure triglycerides: Effects of cooling and heating rate variation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 68, n. 8, p. 591-595, 1991.

Chen, F., Cai, T., Zhao, G., Liao, X., Guo, L., Hu, X. Optimizing conditions for the purification of crude octacosanol extract from rice bran wax by molecular distillation analyzed using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 70, p. 47-53, 2005.

Chen, F., Wang, Z., Zhao, G., Liao, X., Cai, T., Guo, L., Hu, X. Purification process of octacosanol extracts from rice bran wax by molecular distillation. *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 63-68, 2007.

Chen, Y., Dunford, N. T., Edwards, J., Carver, B., Goa, C. Policosanol content and composition of wheat varieties as affected by environment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 89, p. 310-314, 2009.

Chen, Y., Zou, C., Mastalerz, M., Hu, S., Gasaway, C., Tao, X. Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences - A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 12, p. 30223-30250, 2015.

Cherif, A. O., Messaouda, M. B., Kaabi, B., Boukhchina, S., Pepe, C., Kallel, H. Comparison of the Concentrations of Long-Chain Alcohols (Policosanol) in Three Tunisian Peanut Varieties (*Arachis hypogaea L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 12143–12148, 2010.

Chinen, I. 2006. Composition containing higher fatty acid derivative and foods and drinks. US Patent 20060127450.

Cho, K-Y., Bae, M-A., Kim, J-R. Cuban Sugar Cane Wax Acid and Policosanol Showed Similar Atheroprotective Effects with Inhibition of LDL Oxidation and Cholesteryl Ester Transfer via Enhancement of High-Density Lipoproteins Functionality. *Cardiovascular Therapeutics*, v. 2019, 11 p., 2019.

Choi, S. J., Park, S. Y., Park, J. S., Park, S-K., Jung, M. Y. Contents and compositions of policosanols in green tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Chemistry*, v. 204, p. 94-101, 2016.

Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 7ª edição. Campinas - SP: Editora da UNICAMP, 1997.

Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. Fundamentos de cromatografia. 1º edição. São Paulo: editora da UNICAMP, 456p, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira, Cana-de-açúcar, Safra 2020/2021. Primeiro levantamento, 2021. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 03 de agosto 2021.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira, Cana-de-açúcar, Safra 2016/2017. Quarto levantamento, 2017a. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso em: 16 de junho 2020.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Perfil do Setor do Açúcar e do Etanol no Brasil. Safra 2014/2015, v.3, p. 1-64, Brasília, 2017b. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso em: 16 de junho 2020

Consolazio, C. F., Matoush, L. O., Nelson, R. A., Isaac, G. J., Hursh, L. M. Effect of Octacosanol, Wheat Germ Oil, and Vitamin E on Performance of Swimming Rats. *Journal of Applied Physiology*, v. 19, p. 265-267, 1964.

Costa, F. N., Leitão, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 336-347, 2010.

Cottom, W. P. Waxes. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Fourth Edition. Publ: Wiley-Inter Science, New York, v. 25, p. 314-319, 1994.

Cravotto, G., Gaudino, E. C., Barge, A., Binello, A., Albertino, A., Aghemo, C. Synthesis of 1-octacosanol and GC-C-IRMS discrimination of samples from different origin. *Natural Product Research*, v. 24, n. 5, p. 428-439, 2010.

Cruz, R. A. S., Almeida, H., Fernandes, C. P., Joseph-Nathan, P., Rocha, L., Leitão, G. G. A New Tropane Alkaloid from the Leaves of *Erythroxylum subsessile* Isolated by pH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 39, p. 1273-1277, 2016.

Cuevas, M. S., Crevelin, E. J., Moraes, L. A. B., Oliveira, A. L., Rodrigues, C. E. C., Meirelles, A. J. A. Solubility of commercial octacosanol in organic solvents and their correlation by thermodynamic models at different temperatures. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 110, p. 186-192, 2017.

Curling, J. Process chromatography: Five decades of innovation. *BioPharm International*, v. 20, p. 10-19. 2007.

Deamicis, C., Edwards, N. A., Giles, M. B., Harris, G. H., Hewitson, P., Janaway, L., Ignatova, S. Comparison of preparative reversed phase liquid chromatography and countercurrent chromatography for the kilogram scale purification of crude spinetoram insecticide. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 36, p. 6122-6127, 2011.

Deepam, L. S. A., Arumughan, C. Effect of saponification on composition of unsaponifiable matter in rice bran oil. *Journal of Oleo Science*, v. 61, n. 5, p. 241 – 247, 2012.

Deffense, E. Fractionation of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 62, n.2, p. 376-385, 1985.

Del Río, J. C., Marques, G., Lino, A. G., Lima, C. F., Colodette, J. L., Gutiérrez, A. Lipophilic phytochemicals from sugarcane bagasse and straw. *Industrial Crops and Products*, v. 77, n. 23, p. 992–1000, 2015.

Ebrahim, R. M. A. Thermal and Structural Characterization of Beeswax Samples and their Chromatographic Fractionated Components. 59p. Master degree, Department of Applied Chemistry and Chemical Technology, University of Gezira, Wad Medani, Sudão, 2015.

- Ehimen, E. A., Sun, Z. F., Carrington, C. G. Variables affecting the in-situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, v. 89, p. 677-684, 2010.
- Engel, R. G., Kriz, G. S., Lampman, G. M., Pavia, D. L. *Química Orgânica experimental: Técnicas de pequena escala*. 3 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- Fathi-Azarjebayjani, A., Mabhoot, A., Martinez, F., Jouyban, A. Modeling, solubility, and thermodynamic aspects of sodium phenytoin in propylene glycol–water mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, v. 219, p. 68-73, 2016.
- Feng, S., Luo, Z., Zeng, F., Liu, S., Khan, Z. U. Effect of water, metallic ions, fatty acid and temperature on oxidative stability of 1-octacosanol from sugarcane rind. *Food Chemistry*, v. 182, p. 171-177, 2015.
- Ferreira, A. D. *Centerquímica, química na medicação certa: Aumento de Extração com Nova Tecnologia*. In: 21º Seminário Regional Sobre Cana-de-açúcar. Imbiribeira, Recife: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil (STAB), 2017.
- Fernandez-Arche, A., Marquez-Martín, A., Vazquez, P. R., Perona, J. S., Terencio, C., Perez-Camino, C., Ruiz-Gutierrez, V. Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 20, p.155-162, 2009.
- Freedman, B., Pryde, E. H., Mounts, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, 1984.
- Friesen, J. B., Pauli, G. F. G.U.E.S.S.- A Generally Useful Estimate of Solvent Systems for CCC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 28, p. 2777-2806, 2005.
- Friesen, J. B., Pauli, G. F. Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1151, p. 51-59, 2007.
- Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Chen, S-n., Pauli, G. F. Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. *Journal of Natural Products*, v. 78, n. 7, p. 1765–1796, 2015.
- 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.

Gandra, K. M. Obtenção e Caracterização de Cera de Cana-de-Açúcar e Suas Frações. 148f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

Gao, W., Liu, D., Su, S. High-Performance Thin-Layer Chromatography for Quantification of 1-Octacosanol in Antarctic Krill (*Euphausia superba Dana*). Journal of Chromatographic Science, v. 53, p. 811-815, 2015.

García, A. G., Rodríguez, J. L., Tío, M. V. Producción de Cera y Grasas a Partir de Cachaza. In: La Industria de los Derivados de la Caña de Azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Editorial Científico-Técnica La Habana, 594 p., 1986.

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, 474p., p.399-404, 1999.

García, A. G., Rodríguez, G. B., Tío, M. V. Cera Refinada de Cachaza. In Taupier, L. O. G. Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), 3ed. Habana: Imprenta Minaz, p. 359-363, 2000.

García, A., García, M. A., Ribas, M., Brown, A. Recuperación de cera de cutícula de caña de azúcar mediante separación macánica y extracción con solventes. Grasa y Aceites, v. 54, n. 2, p. 169-174, 2003.

Garrard, I. J. Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 28, p. 1923-1935, 2005.

George, P. A. O., Eras, J. J. C., Gutierrez, A. S., Hens, L., Vandecasteele, C. Residue from Sugarcane Juice Filtration (Filter Cake): Energy Use at the Sugar Factory, Waste Biomass Valor, v. 1, p. 407-413, 2010.

- Georges, P., Sylvestre, M., Ruegger, H., Bourgeois, P. Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. *Steroids*, v. 71, p. 647-652, 2006.
- Giuffrè A, M., Capocasale, M. Policosanol in Tomato (*Solanum lycopersicum L.*) Seed Oil: The Effect of Cultivar. *Journal of Oleo Science*, v. 64, p. 625- 631, 2015.
- Gnanaraj, R. A. Applications of Sugarcane Wax and it's Products: A Review. *International Journal of ChemTech Research*, v. 4, n. 2, p. 705-712, 2012.
- Gorog, S. Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, p. 852-862, 2003.
- Goff, M. J., Bauer, N. S., Lopes, S., Sutterlin, W. R., Suppes, G. J. Acid-catalyzed alcoholysis of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 81, p. 415-420, 2004.
- Gonçalves, L. V. F. Caracterização dos lipídios e outros constituintes de tortas-de-filtro de usinas açucareiras do município de Campos. 145p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 1998.
- González-Fernández, M. J., Fabrikov, D., Lyashenko, S., Ferrón-Carrillo, F., Guill-Guerrero, J. L. Highly concentrated very long-chain PUFA obtainment by Urea complexation methodology. *Environmental Technology & Innovation* v. 18, 7 p., 2020.
- Gouni-Berthold, I., Berthold, H. K. Policosanol: clinical pharmacology and therapeutic significance of a new lipid-lowering agent. *American Heart Journal*, v. 143, p. 356-365, 2002.
- Gracien, J., Arévalo, G. Wax composition of sunflower seed oil. *Grasas y Aceites*, v. 32, p. 1-5, 1981.
- Guidechem - Chemical Trading Guide, 2021. Disponível em: <<https://www.guidechem.com/encyclopedia/1-octacosanol-dic5129.html>>. Acesso em: 11 maio 2021.
- Guillén, M. D., Cabo N. Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 75, p. 1–11, 1997.

- Gunawan, S., Vali, S. R., Ju, Y-H. Purification and Identification of Rice Bran Oil Fatty Acid Steryl and Wax Esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 83, n. 5, 2006.
- Gunstone, F. D., Padley, F. B. *Lipid Technology and Applications*. New York: Marcel Dekker, 834 p., 1997.
- Guo, T., Lin, Q., Li, X., Nie, Y., Wang, L., Shi, L., Xu, W., Hu, T., Guo, T., Luo, F. Octacosanol Attenuates Inflammation in Both RAW264.7 Macrophages and a Mouse Model of Colitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 3647-3658, 2017a.
- Guo, W., Zhu, Y., Han, Y., Wei, Y., Luo, B. Separation Mechanism of Fatty Acids from Waste Cooking Oil and Its Flotation Performance in Iron Ore Desiliconization. *Minerals*, v. 7, n. 12, p. 244-257, 2017b.
- Halket, J. M., Zaikin, V. G. Derivatization in mass spectrometry-1. Silylation. *European Journal of Mass Spectrometry*, v. 9, p. 1-21, 2003.
- Hamilton, R. J. Commercial waxes: Their composition and application. In: *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. Scotland: Oily Press Ltd, 1995.
- Harrabi, S., Boukhchina, S., Mayer, P. M., Kallel, H. Policosanol distribution and accumulation in developing corn kernels. *Food Chemistry*, v. 115, p. 918-923, 2009.
- Harrabi, S., Ferchichi, A., Bachel, A., Fellah, H. Policosanol composition, antioxidant and anti-arthritic activities of milk thistle (*Silybummarianum* L.) oil at different seed maturity stages. *Lipids in Health and Disease*, v. 17, 7 p., 2018.
- Harrington, K. J., D'Arcy-Evans, C. Transesterification in situ of sunflower seed oil. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, v. 24, p. 314-318, 1985.
- Harris, K. D. M. Structural and Dynamic Properties of Urea and Thiourea Inclusion Compounds, *Journal of Molecular Structure*, v. 374, p. 241-250, 1996.
- Hartman, L. Lago, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973.

- Hayes, D. G., Bengtsson, Y. C., Van Alstine, J. M., Setterwall, F. Urea Complexation for the Rapid, Ecologically Responsible Fractionation of Fatty Acids from Seed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 10, p. 1403-1409, 1998.
- He, W-S., Liu, Q., Yu, H., Si, X-J., Zhang, J-K. Efficient Synthesis of Octacosanol Linoleate Catalyzed by Ionic Liquid and Its Structure Characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 93, p. 509-517, 2016.
- Henriques, J. D. O., Oliveira, R. M. A., Esteves, M. A. B., Martinez, P. F. M. Extração e Purificação da Cera da Casca de Cana-de-Açúcar. In: São Paulo: Blucher, p. 2633-2636, 2018. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/cobeq2018-PT.0698
- Henon, G. Chromatographic determination of waxes in sunflower oil. *Revue Francaise des Corps Gras*, v. 33, p. 475-482, 1986.
- Hochlowski, J. E., Pan, J. Y., Searle, P. A., Buck, W. R., Spanton, S. G. Purification of Drugs from Biological Fluids by Counter-Current Chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 6162-6169, 2009.
- Huang, X.-Y., Di, D.-L. Chiral Separation by Counter-Current Chromatography. *TrAC. Trends in Analytical Chemistry*, v. 67, p. 128-133, 2015.
- Hwang, K. T., Cuppett, S. L., Weller, C. L., Hanna, M. A., Shoemaker, R. K. Aldehydes in grain sorghum wax. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 79, p. 529-533, 2002a.
- Hwang, K. T., 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. 521-526, 2002b.
- Hwang, K. T., Cuppett, S. L., Weller, C. L., Hanna, M. A. HPLC of grain sorghum wax classes highlighting separation of aldehydes from wax esters and steryl esters. *Journal of Separation Science*, v. 25, p. 619-623, 2002c.
- Hwang, K. T., Kim, J. E., Weller, C. L. Policosanol Contents and Compositions in Wax-Like Materials Extracted from Selected Cereals of Korean Origin. *Cereal Chemistry*, v. 82, n. 3, p.242-245, 2005.
- Inarkar, M. B., Lele, S. S. Extraction and Characterization of Sugarcane Peel Wax. *International Scholarly Research Notices (ISRN): Agronomy*, v. 2012, p. 1-6, 2012.

Ipatzi, C. A. C. Hidrólisis de ceras naturales por medio de carboxilesterasas de *Bacillus sp* para la obtención de alcoholes de alto peso molecular. 106f. Tesis (Maestro en Biotecnología Aplicada). Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, Mexico, 2016.

Irmak, S., Dunford, N. T. Policosanol Contents and Compositions of Wheat Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 5583-5586, 2005.

Irmak, S., Dunford, N. T., Milligan, J. Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. *Food Chemistry*, v. 95, p. 312-318, 2006.

Isbell, T. A., Carlson, K. D., Abbott, T. P., Phillips, B. S., Erhan, S. M., Kleiman, R. Isolation and characterization of wax esters in meadowfoam oil. *Industrial Crops and Products*, v. 5, n. 3, p. 239-243, 1996.

Islam, M. R., Khan, M. M. *The Science of Climate Change*. John Wiley & Sons Inc., 2019.

Ishaka, A., Imam, M. U., Mahamud, R., Zuki, A. B. Z., Maznah, I. Characterization of rice bran wax policosanol and its nanoemulsion formulation. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 2261-2269, 2014.

Isahak, W. N. R. W., RamLi, Z. A. C., Ismail, N., Jahim, J. M., Yarmo, M. A. Recovery and Purification of Crude Glycerol from Vegetable Oil Transesterification. *Separation & Purification Reviews*, v. 44, p. 250-267, 2015.

Ito, Y., Conway, W. D. *High-speed countercurrent chromatography. Chemical analysis*. New York: J. Wiley, 1996.

Ito, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1065, n. 2, p. 145-168, 2005.

Ito, Y., Goto, T., Yamada, S., Matsumoto, H., Oka, H., Takahashi, N., Nakazawa, H., Nagase, H., Ito, Y. Application of dual counter-current chromatography for rapid sample preparation of N-methylcarbamate pesticides in vegetable oil and citrus fruit. *Journal of Chromatography A*, v. 1108, p. 20-25, 2006a.

Ito, Y., Goto, T., Yamada, S. A., Ohno, T., Matsumoto, H., Oka, H., Ito, Y. Rapid determination of carbamate pesticides in food using dual countercurrent

chromatography directly interfaced with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1187, p. 53-57, 2008.

Jain, D., Basniwal, P. K. Review: Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 86, p. 11- 35, 2013.

Jesus, S. S., Ferreira, G. F., Maciel, M. R. W., Maciel Filho, R. Biodiesel purification by column chromatography and liquid-liquid extraction using green solvents. *Fuel*, v. 235, p. 1123–1130, 2019.

Jin, Y.-R., Zhang, L.-Z., Han, S.-J., Zhang, L.-X., Zhang, J.-M., Zhou, G.-Q., Dong, H.-B. Behavior of Lanthanides in Countercurrent Chromatography Using Dihexyl-N, N Diethyl carbamoyl Methylene Phosphonate as Stationary Phase. *Journal of Chromatography A*, v. 888, p. 137-144, 2000.

Jung, D. M., Lee, M. J., Yoon, S. H., Jung, M. Y. A Gas Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometric Analysis of Policosanols in Commercial Vegetable Oils. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 6, p. 891-899, 2011.

Jung, D. M., Yoon, S. H., Jung, M. Y. Chemical properties and oxidative stability of Perilla oils obtained from roasted Perilla seeds as affected by extraction methods. *Journal of Food Science*, v. 77, p. 1249-1255, 2012.

Kaewkool, P., Kittiratanapiboon, K., Aryasuk, K., Krisnangkura, K. Micro-reactor for transesterification of plant seed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 111, n. 5, p. 474-480, 2009.

Karnofsky, G. The theory of solvent extraction. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 26, n. 10, p. 564-569, 1949.

Kaushik, M. K., Aritake, K., Takeuchi, A., Yanagisawa, M., Urade, Y. Octacosanol restores stress-affected sleep in mice by alleviating stress. *Nature*, n. 8892, p. 1-8, 2017.

Kendall, D., Booth, A. J., Levy, M. S., Lye, G. J. Separation of supercoiled and open-circular plasmid DNA by liquid-liquid counter-current chromatography. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 613-619, 2001.

Keyes, D. B. Esterification processes and equipment. *Industrial & Engineering Chemistry*, v. 24, n. 10, p. 1096-1103, 1932.

Khan, B. M., Liu, Y. High speed counter current chromatography: Overview of solvent-system and elution-mode. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 41, n. 10, p. 629-636, 2018.

Kim, J-Y., Kim, S-M., Kim, S-J., Lee, E. Y., Kim, J. R., Cho, K-H. Consumption of policosanol enhances HDL functionality via CETP inhibition and reduces blood pressure and visceral fat in young and middle-aged subjects. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 39, p. 889-899, 2017.

Kim, K. H., Oh, H. K., Heo, B., Kim, N. A., Lim, D. G., Jeong, S. H. Solubility evaluation and thermodynamic modeling of β -lapachone in water and ten organic solvents at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, v. 472, p.1-8, 2018.

Knight, M., Finn, T. M., Zehmer, J., Clayton, A., Pilon, A. Spiral Counter-Current Chromatography of Small Molecules, Peptides and Proteins Using the Spiral Tubing Support Rotor. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 6148-6155, 2011.

Knuutinen, U., Norrman, A. Wax analysis in conservation objects by solubility studies, FTIR and DSC. 15th World Conference on Nondestructive Testing, Rome (Italy), 2000.

Kolodziejczyk, P. POS pilot plant corporation - Canola Council of Canada: Identification of waxes in canola waxes, 2000.

Kurumaya, K., Sakamoto, T., Okada, Y., Kajiwara, M. Application of droplet counter-current chromatography to the isolation of vitamin B12. *Journal of Chromatography A*, v. 435, p. 235-240, 1988.

Laguna-Granja, A., Hernández, M., Quintana, D. C., Valmana, L. A., Ferreiro, R. M., Mesa, M. G. Mixture of higher primary aliphatic alcohols, its obtention from sugar cane wax and its pharmaceutical uses. U. S. Patent 5.663.156, 1997.

Laguna-Granja, A., Hernández, M., Quintana, D. C., Valmana, L. A., Ferreiro, R. M., Mesa, M. G. Mixture of higher primary aliphatic alcohols, its obtention from sugar cane wax and its pharmaceutical uses. U. S. Patent 5.856.316, 1999.

Leal, O. B. La integración de la docencia, la investigación y la producción agropecuaria, area estratégica para la colaboración internacional. In: Gazzola, A. L.

A., Almeida, S. G. Universidade, Cooperação Internacional e Diversidade. Belo Horizonte, Editora UFMG, 2006.

Leca, M., Tcacenco, L., Micutz, M., Staicu, T. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 15, n. 5, 2010.

Lee, D-W., Park, Y-M., Lee, K-Y. Heterogeneous Base Catalysts for Transesterification in Biodiesel Synthesis. *Catalysis Surveys from Asia*, v. 13, p. 63-77, 2009.

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, E., Rudolph, V. Transesterification of vegetable oil to biodiesel over MgO-functionalized mesoporous catalysts. *Energy Fuels*, v. 22, p. 145–149, 2008.

Liang, N., Cai, P., Wu, D., Pan, Y., Curtis, J. M. High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC) purification of antifungal hydroxyl unsaturated fatty acids from plant-seed oil and *Lactobacillus* Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 11229-11236, 2017.

Liaw, H. J., Lee, Y. H., Tang, C. L., Hsu, H. H., Liu, J. H. A Mathematical Model for Predicting the Flash Point of Binary Solutions. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, v. 15, n. 6, p. 429-438, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0950-4230\(02\)00068-2](https://doi.org/10.1016/S0950-4230(02)00068-2).

Liu, H., Biliaderis, C. G., Przybylski, R., Eskin, N. A. M. Effects of crystallization conditions on sedimentation in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 71, n. 4, p. 409-415, 1994.

Liu, Y., Friesen, J. B., McApline, J. B., Pauli, G. F. Solvent System Selection Strategies in Countercurrent Separation. *Planta Medica*, v. 81, p. 1582-1591, 2015.

Lopes, J. D. 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.). 138 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

- López-López, A., Montañó, A., Ruíz-Méndez, M. V., Garrido-Fernández, A. Sterols, Fatty Alcohols, and Triterpenic Alcohols in Commercial Table Olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 85, p. 253-262, 2008.
- Lotero, E., Liu, Y., Lopez, D. E., Suwannakarn, K., Bruce, D. A., Goodwin, J. G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 44, p. 5353-5363, 2005.
- Luca, S. V., Miron, A., Ignatova, S., Skalicka-Wozniak, K. An overview of the two-phase solvent systems used in the countercurrent separation of phenylethanoid glycosides and iridoids and their biological relevance. *Phytochemistry Reviews*, p. 1-27, 2019.
- Lucas, A., García, A., Alvarez, A., Gracia, I. Supercritical extraction of long chain n-alcohols from sugar cane crude wax. *Journal of Supercritical Fluids*, v.41, p. 267-271, 2007.
- Lucas, A. M. Estudo sistemático de obtenção e impregnação supercrítica de extratos de Baccharis. Porto Alegre. 2015. Dissertação (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Ludwig, F. J. Analysis of Microcrystalline Waxes by Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 37, p. 1732–1737, 1965.
- Lukic, M., Lukic, I., Sladonja, B., Pilizota, V. Policosanol variation in olive oil as a result of variety, ripening, and storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 117, p. 1248-1260, 2015.
- Luo, Y., Li, S., Ho, C-S. Sugarcane rind: applications and health benefits: a review. *Journal of Food Bioactives*, v. 3, p. 1-7, 2018.
- Luque-Garcia, J. L., Luque de Castro, M. D. Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, p. 41-47, 2003.
- Ma, J., Ma, L., Zhang, H., Zhang, Z., Wang, Y., Li, K., Chen, X. Policosanol fabrication from insect wax and optimization by response surface methodology. *Plos One*, 14 p., 2018.
- Mahadevan, V. Fatty alcohols: Chemistry and metabolism. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, n. 4, v. 15, p. 255-299, 1978.

- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.
- 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.
- Marinangeli, C. P. F., Jones, P. J. H., Kassis, A. N., Eskin, M. A. N. Policosanols as Nutraceuticals: Fact or Fiction. *Food Science and Nutrition*, v. 50, n. 3, p. 259-267, 2010.
- Marchetti, J. M., Miguel, V. U., Errazu, A. F. Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 11, p. 1300-1311, 2007.
- Marchetti, J. M., Errazu, A. F. Esterification of free fatty acids using sulfuric acid as catalyst in the presence of triglycerides. *Biomass & Bioenergy*, v. 32, p. 892-895, 2008.
- Martins, P. F. Estudos e Experimentos Para a Concentração de Tocoferóis e Fitoesteróis por Meio da Destilação Molecular. 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- Martuchi, E. T. Tecnologia do açúcar de cana. In: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1.ed. Campinas, 163 p., 1983.
- McAlpine, J. B., Friesen, J. B., Pauli, G. F. Separation of Natural Products by Countercurrent Chromatography. In Sarker, S. D., Nahar, L. (eds.). *Natural Products Isolation*, v. 864. Totowa, NJ: Humana Press, p. 221-254, 2012.
- McCarthy, R. D.; Duthie, A. H. A rapid quantitative method for the separation of free-fatty acids from other lipids. *Journal of Lipid Research*, v.3, n.1, p. 117-119, 1962.
- McLoud, E. S., Sugar Cane Waxes. In: Chemical Specialties Manufacturers Association Meeting, 1950.
- Mekaoui, N., Faure, K., Berthod, A. Advances in Countercurrent Chromatography for Protein Separations. *Bioanalysis*, v. 4, p. 833-844, 2012.

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.

Miao, X., Li, R., Yao, H. Effective acid-catalyzed transesterification for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, v. 50, p. 2680-2684, 2009.

Milani, A., Lucci, P., Sedran, M., Moret, E., Moret, S., Conte, L. Improved method for determination of waxes in olive oils: reduction of silica and use of a less hazardous solvent. *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, v. 27, n. 20, 8p., 2020.

Mudge, S. M., Belanger, S. E., DeLeo, P. C. *Fatty Alcohols: Anthropogenic and Natural Occurrence in the Environment*. Royal Society of Chemistry; 2nd edition, 2018. ISBN 978-1-78801-362-8. doi: 10.1039/9781788013840

Multiceras. *Aplicaciones*, 2018. Disponível em: <<http://multiceras.com/aplicaciones/>> Acesso em: 24 fevereiro 2021.

Nandini, N., Shashidhara, S., Deepak, M., Sangli, G. K. HPTLC Quantification Of N-Octacosanol In *Tinospora Cordifolia* Miers Stems Obtained from Different Geographical Regions. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 3, n. 12, p. 5075-5078, 2012.

Nassu, R. T. Estudo do comportamento térmico de óleos e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC). 93p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994.

Nazato, C., Torres, N. H., Ferraz, S. C. U., Vilca, F. Z., Silva, D. F. S., Aguiar, C. L., Harder, M. N. C. Employment of Wax Sugarcane (*Saccharum Officinarum*) in Formulation of a Lip Gloss by Simple Extraction and Bioethanol. *American Journal of Biochemistry*, v. 2, n. 5, p. 89-93, 2012.

NPCS - NIIR Project Consultancy Services. *Waxes: Types, Major Markets, Demand and Supply*, 2013. Available in: <<http://www.niir.org/information/content.phtml?content=239>> Access in: may 08 2017.

Nu-Check Prep, Inc. - The Home of Fine Lipid Organics. Elysian, MN, USA. General Product Information Catalog. Disponível em: <http://www.nu-chekprep.com/catalog.pdf>>. Acesso em: 17 abril 2020.

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.

OficialFarma - Policosanol 10Mg 60Cápsulas. Disponível em: <<https://www.oficialfarma.com.br/policosanol-10mg-60capsulas/p>>. Acesso em: 06 maio 2021.

Ohta, Y., Ohashi, K., Matura, T., Tokunaga, K., Kitagawa, A., Yamada, K. Octacosanol attenuates disrupted hepatic reactive oxygen species metabolism associated with acute liver injury progression in rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 42, p. 118-125, 2008.

Oliveira, R. S. P. Estudo da Viabilidade Técnica da Produção de Biodiesel a Partir do Óleo de Cera de Cana-de-Açúcar. 113p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

Oliveira, R. M. A. Avaliação de Terpenos Como Solventes no Processo de Extração da Cera de Cana-de-Açúcar. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

Orata, F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. In: Mohd, M. A. (Ed.). *Advanced Gas Chromatography-Progress In Agricultural, Biomedical And Industrial Applications*. Rijeka, Croatia: InTech, v. 1, cap. 5, p. 83-108, 2012.

Ou, S., Zhao, J., Wang, Y., Tian, Y., Wang, J. Preparation of octacosanol from filter mud produced after sugarcane juice clarification. *LWT - Food Science and Technology*, v. 45, p. 295-298, 2012.

Paixão, A. L. Obtenção de concentrado de álcoois graxos de cadeia longa a partir de cera de cana de açúcar saponificada e acidulada. 88f. Dissertação (Mestrado em

Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

Parish, E. J., Grainger, W. S. Chemistry of Waxes and Sterols. In: Akoh, C. C. Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. 4th edition. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2017.

Paturau, J. M. By-products of the Cane Sugar Industry. New York: Elsevier Publishing Company, 1989.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. R. Introduction to Spectroscopy. Cengage Learning, 4th ed., 2008.

Pérez, M. D., Larios, M. E., Marrero, R. M. Estudio de la distribución de la cera en las distintas partes de la cana. Centro Azúcar, v. 20, n. 3, p. 6-10, 1993.

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.

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, P. Vegetable Oils as a Source of Wax Ester: Extraction and Transesterification. Research Journal of Chemical Sciences, v. 6, p. 69-72, 2016.

Pimenta, E., Sharma, P. The Foreseeable Challenges of the Global Wax Industry. Kline & Company Inc. Available in: <<http://www.klinegroup.com/blogs/index.php/2017/03/13/the-foreseeable-challenges-of-the-global-wax-industry/>> Acesso em: 24 fevereiro 2021.

Pinto, A. C., Antunes, O. A. C., Rezende, C. M., Correia, C. R. D. Separation of acidic componentes of *Vellozia flavicans* by silica gel/potassium hydroxide chromatography. Phytochemical Analysis, v. 8, n. 1, p. 14-17, 1997.

Pinto, A. C., Braga, W. F., Rezende, C. M., Garrido, F. M. S., Veiga Jr, V. F., Bergter, L., Patitucci, M. L., Antunes, O. A. C. Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash Chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 11, n. 4, p. 355-360, 2000.

Pisarello, M. L., Costa, B. D., Mendow, G., Querini, C. A. Esterification with ethanol to produce biodiesel from high acidity raw materials: Kinetic studies and analysis of secondary reactions. *Fuel Processing Technology*, v. 91, n. 9, p. 1005-1014, 2010. doi: 10.1016/j.fuproc.2010.03.001.

Pope, L. E., Marcelletti, J. F., Katz, L. R., Lin, J. Y., Katz, D. H., Parish, M. L., Spear, P. G. The antiherpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process. *Antiviral Research*, v. 40, p. 85-94, 1998.

Pulidindi, K. Wax Market Share, Trends Statistics - Industry Report 2017 – 2024. Report ID: GMI2407. Global Market Insights Inc., 2016.

Purcell, D. E., Leonard, G. J., O'Shea, M. G., Kokot, S. A chemometrics investigation of sugarcane plant properties based on the molecular composition of epicuticular wax. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 76, p. 135-147, 2005.

Quartier, S. A cana que dá garapa. ACidade ON, Ribeirão Preto, 23 novembro 2014. Disponível em: <<https://www.acidadeon.com/ribeiraopreto/cotidiano/cidades/NOT,2,140,1011548,A+cana+que+da+garapa.aspx>>. Acesso em: 24 fevereiro 2021.

Queiroga, C. L., Cavalcante, M. Q., Ferraz, P. C., Coser, R. N., Sartoratto, A., Magalhães, P. M. High-speed countercurrent chromatography as a tool to isolate nerolidol from the *Baccharis dracunculifolia* volatile oil. *Journal of Essential Oil Research*, v. 26, n. 5, p. 334-337, 2014.

Qi, G., Peng, F., Xiong, L., Lin, X., Huang, C., Li, H., Chen, X., Chen, X. Extraction and characterization of wax from sugarcane bagasse and the enzymatic hydrolysis of dewaxed sugarcane bagasse. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 47, n. 3, p. 276-281, 2017.

Rabelo, S. C., Costa, A. C., Rossell, C. E. V. Industrial Waste Recovery. In: Santos, F., Borém, A., Caldas, C. Sugarcane: Agricultural production, bioenergy, and ethanol Publisher, Amsterdam: Elsevier, p. 365-381, 2015.

Ramljak, Z., Solc, A., Arpino, P., Schmitter, J-M., Guiochon, G. Separation of acids from asphalts. *Analytical Chemistry*, v. 49, n. 8, p. 1222-1225, 1977.

Ratnayake, W. M. N, Olsson, B., Matthews, D., Ackman, R. G. Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oils via Urea Complexation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.9, n. 10, p. 381-386, 1988.

Ramos-Zambrano, E., Herrera-Serrano, P., García-Dávila, J., Ríos-Cortés, G., Jiménez-Aparicio, A. R., Martínez-Ayala, A. L. Cochineal Waxy Residues as Source of Policosanol: Chemical Hydrolysis and Enzymatic Transesterification. *Journal of Chemistry*, v. 2019, 10 p., 2019.

Řezanka, S., 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, p. 916-923, 2006.

Rios, L. F., Klein, B. C., Luz, L. F. Jr, Maciel, R. F., Wolf, M. R. M. Nitrogen Starvation for Lipid Accumulation in the Microalga Species *Desmodesmus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 469-476, 2015.

Rohr, R., Trujillo-Quijano, J. A. Process for extraction and concentration of liposoluble vitamins and provitamins, growth factors and animal and vegetable hormones from residues and by products of industrialized animal and vegetable products. Patent US 2000/006344573B1. 2000.

Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R. P., Saraiva, J. A., Boussetta, N., Grimi, N., Barba, F. J. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science & Technology*, v. 45, p. 296-310, 2015.

Royal Society of Chemistry (RSC). ChemSpider database, 2020. Royal Society of Chemistry, UK. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 19 junho 2020.

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

Sánchez, M., Marchetti, J. M., El Boulifi, N., Martínez, M., Aracil, J. Jojoba oil biorefinery using a green catalyst. Part II: Feasibility study and economical assessment. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 9, p. 139-146, 2015.

Santos, D. G., Castro, V. S., Junior, C. A. C., Pinto, A. C., Uekane, T. M., Rezende, C. M. *Copaifera Reticulata: Caracterização Química e Atividade Bactericida Frente à Patógenos Encontrados em Alimentos*. *Revista Virtual de Química*, v. 12, n. 2, 8p., 2020.

Schlenk, H., Holman, R. T. Separation and Stabilization of Fatty Acids by Urea Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 72, p. 5001-5004, 1950.

Schröder, M., Vetter, W. Detection of 430 Fatty Acid Methyl Esters from a Transesterified Butter Sample. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 90, n. 6, p. 771-790, 2013.

Scott, C. G. Rowel, D. A. Gas-Solid Chromatographic Separation of Hydrocarbons of High Molecular Weight. *Nature*, v. 187, p. 143-144, 1960.

Sebastian, J., Muraleedharan, C., Santhiagu, A. A comparative study between chemical and enzymatic transesterification of high free fatty acid contained rubber seed oil for biodiesel production. *Cogent Engineering*, v. 3, 12 p., 2016.

Sengupta, S., Nandi, I., Bhattacharyya, D. K., Ghosh, M. Anti-Oxidant and Anti-Bacterial Properties of 1-Octacosanol Isolated from Rice Bran Wax. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, v. 6, 8 p., 2018.

Shahidi, F., Wanasundara, U. N. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, p. 230-240, 1998.

Shahidi, F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products – 6th ed.* New York: John Wiley & Sons, 2005.

Sharma, R., Matsuzaka, T., Kaushik, M. K., Sugasawa, T., Ohno, H., Wang, Y., Motomura, K., Shimura, T., Okajima, Y., Mizunoe, Y., Ma, Y., Saber, Z. M., Iwasaki, H., Yatoh, S., Suzuki, H., Aita, Y., Han, S., Takeuchi, Y., Yahagi, N., Miyamoto, T., Sekiya, M., Nakagawa, Y., Shimano, H. Octacosanol and policosanol prevent high-fat

diet-induced obesity and metabolic disorders by activating brown adipose tissue and improving liver metabolism. *Nature*, v. 9, n. 5169, 2019.

Shen, J., Luo, F., Lin, Q. Policosanol: Extraction and biological functions. *Journal of Functional Foods*, v. 57, p. 351-360, 2019.

Shimizu, K., Kuribayashi, H., Watanabe, H., Shimasaki, T., Azuma, K., Horie, Y., Saitoh, K., Saito, S., Shibukawa, M. Multistep pH-Peak-Focusing Countercurrent Chromatography with a Polyethylene Glycol-Na₂SO₄ Aqueous Two Phase System for Separation and Enrichment of Rare Earth Elements. *Analytical Chemistry*, v. 85, p. 978-984, 2013.

Shu, X., Duan, W., Liu, F., Shi, X., Geng, Y., Wang, X., Yang, B. Preparative Separation of Polyphenols from the Flowers of *Paeonia lactiflora* Pall. by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 947-948, p. 62-67, 2014.

Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 7th ed., 2005.

Sin, E. H. K. The extraction and fractionation of waxes from biomass. PhD, Department of Chemistry, University of York, United Kingdom, 2012.

Sin, E. H. K., Marriott, R., Hunt, A. J., Clark, J. H. Identification, quantification and Chrastil modelling of wheat straw wax extraction using supercritical carbon dioxide. *Comptes Rendus Chimie*, v. 17, p. 293-300, 2014.

Singh, D. K., Li, L., Porter, T. D. Policosanol inhibits cholesterol synthesis in hepatoma cells by activation of AMP-kinase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 318, p. 1020-1026, 2006.

Skooge, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.

Skoog, D. A., West, D. A., Holler, F. J., Crouch, R. S. *Fundamentos de química analítica*. 8º ed. São Paulo: Thomson, 999 p., 2008.

Sluiter, R. R., Scarlata, C. J., Sluiter, D. Templeton: Determination of Extractives in Biomass (Technical Report). National renewable energy laboratory, 2005.

Smith, B. C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press Book. 2nd Edition, 2011.

Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), *Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017*. Sociedade Brasileira de Cardiologia, ISSN-0066-782X, v.109, n. 2, Supl. 1, Agosto 2017.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3^o ed. New York: Wiley, 2011.

Sociedade Brasileira De Cardiologia (SBC), *Cardiômetro*. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/>>. Acesso em: 10 agosto 2021.

Solomon, S. *Sugarcane By-Products Based Industries in India*. Sugar Tech, v. 13, n. 4, p. 408-416, 2011.

Soomro, R. K., Sherazi, S. T. H. *Extraction and characterization of seed oil waxes by using chromatographic techniques*. International Journal of Industrial Chemistry, v. 4, n. 9, 2013.

Srisaipet, A., Aoopkham, M. *Extraction Purification and Composition Determination of Policosanols from Thai Beeswax*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, v. 9, n. 8, p. 42-47, 2015.

Srisaipet, A., Yasamoot, D., Somsri, S. *Development of microwave energy to the fast extraction of policosanol from beeswax*. International Journal of Applied Chemistry, v. 12, p. 39-44, 2016.

Srisaipet, A., Phromchan, S., Jaipaeng, T. *Policosanol extraction from beeswax and improvement of the purity*. Fluids and Chemical Engineering Conferece (FluidsChE 2017), Series MATEC Web of Conferences, v. 111, 2017.

Srisaipet, A., Luangpitak, P., Potisen, P. *The Policosanol Extraction and Composition Characterization from Wheat Straw By-Product of Thai Wheat Varieties*. International Journal of Food Engineering, v. 5, n. 2, p. 99-103, 2019.

Sumner, N. *Developing counter current chromatography to meet the needs of pharmaceutical discovery*. Journal of Chromatography A, v. 1218, n. 36, p. 6107-6113, 2011.

Suwannakarn, K., Lotero, E., Ngaosuwan, K., Goodwin Jr., J. G. Simultaneous free fatty acid esterification and triglyceride transesterification using a solid acid catalyst with in situ removal of water and unreacted methanol. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 48, n. 6, p. 2810-2818, 2009. doi: 10.1021/ie800889w.

Tamaki, H., Man, S. L., Ohta, Y., Katsuyama, N., Chinen, I. Inhibition of Osteoporosis in Rats Fed with Sugar Cane Wax. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 67, n. 2, p. 423-425, 2003.

Tang, H., Wu, B., Chen, K., Pei, H., Wu, W., Ma, L., Peng, A., Ye, H., Chen, L. Separation of Flavonoids from *Millettiagriffithii* with High-Performance Counter-Current Chromatography Guided by Anti-Inflammatory Activity. *Journal of Separation Science*, v. 38, p. 523-529, 2015.

Taylor, J. C., Rapport, L., Lockwood, G. B. Octacosanol in Human Health. *Nutrition*, v. 19, p. 192-195, 2003.

The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Topic Q3D: Guideline for elemental impurities, p. 1-77, 2014.

Thomas, A. Fats and Fatty Oils. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH, p. 1-63, 2005.

Thomas, A. E. Fractionation and winterization: processes and products. In: Applewhite, T. H. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products - Vol. 3*. New York: John Wiley & Sons, p. 1-39, 1985.

Tulloch, A. P., Hoffman, L. L. Leaf Wax of *Triticum Aestivum*. *Phytochemistry*, v. 12, p. 2217 - 2223, 1973.

United States Pharmacopoeia (USP). 37 ed. Chemical Testes, 467, residual solvents, p. 1-12, 2013.

Uribarri, E., Laguna, A., Sierra, R., Ricardo, Y. Physico-mechanical characterization of policosanol, a novel hypocholesterolemic drug. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 28, p. 89-93, 2002.

Valix, M. G. Food grade wax and process for preparing same. US Patent 0076732A1, 2004.

Vieira, T. M. F. S. Obtenção de cera de cana-de-açúcar a partir de subproduto da indústria sucro-alcooleira: Extração, Purificação e Caracterização. 139f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

Vieira, F. S. V., Rebouças, M. V., Andrade, J. B. Determinação de compostos carbonilados e carboxilados em derivados de petróleo. *Química Nova*, v. 35, n. 8, p. 1644-1656, 2012.

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

Viola, F., Oliaro, S., Binello, A., Cravotto, G. Policosanol: updating and perspectives. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 1, p. 77-83, 2008.

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

Wagner, H., Blatt, S., *Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2th Edition, 384p., 1996.

Wanasundara, U. N., Shahidi, F. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. *Food Chemistry*. v. 65, p. 41-49, 1999.

Wang, M. F., Lian, H. Z., Mao, L., Zhou, J. P., Gong, H. J., Qian, B. Y., Fang, Y., Li, J. Comparison of various extraction methods for policosanol from rice bran wax and establishment of chromatographic fingerprint of policosanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 5552-5558, 2007.

Wang, T., Liu, Y. Y., Wang, X., Yang, N., Zhu, H. B., Zuo, P. P. Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 31, p. 765-774, 2010.

Warth, A. H. *The Chemistry and Technology of Waxes*. Reinhold Publishing Corporation. Second Edition, 1956.

Weerawatanakorn, M., Asikin, Y., Takahashi, M., Tamaki, H., Wada, K., Ho, C. T., Chuekittisak, R. Physico-chemical properties, wax composition, aroma profiles, and antioxidant activity of granulated non-centrifugal sugars from sugarcane cultivars of Thailand. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n.11, p. 4084-4092, 2016.

Weerawatanakorn, M., Tamaki, H., Asikin, Y., Wada, K., Takahashi, M., Ho, C. T., Pan, M. H. Policosanol contents, volatile profile and toxicity test of granulated cane sugar enriched with rice bran materials. *International Food Research Journal* v. 24, v. 3, p. 1019-1028, 2017.

Weerawatanakorn, M., Meerod, K., Wongwaiwech, D., Ho, C-T. Policosanols: Chemistry, Occurrence, and Health Effects. *Current Pharmacology Reports*, v. 5, p. 131-149, 2019. doi :10.1007/s40495-019-00174-9

Wei, H. An overview of wax production, requirement and supply in the world market. *European Chemical Bulletin*, v. 7, p. 266-268, 2012.

Weller, C. L., Cuppett, S. L., Hua, L. C., Lochte-Watson, K. R., Gaudoin, C., Arrault, J., Hubbard, C. M., Mua, J. P. Solvent influence on yield and fractions of grain sorghum wax. Conference paper: ASAE Annual International Meeting, Wisconsin, USA, 2000.

Winterhalter, P. Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 507- 513, 2007.

Wolfmeier, U., Schmidt, H., Heinrichs, F. L., Michalczyk, G., Payer, W., Dietsche, W., Boehlke, K., Hohner, G., Wildgruber, J. Waxes. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 1-63, 2005.

World Health Organization (WHO), The top 10 causes of death, 2019. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>.

Acesso em: 07 abril 2021.

Yu, J., Zhao, H., Wang, D., Song, X., Zhao, L., Wang, X. Extraction and purification of five terpenoids from olibanum by ultrahigh pressure technique and high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 40, p. 2732-2740, 2017.

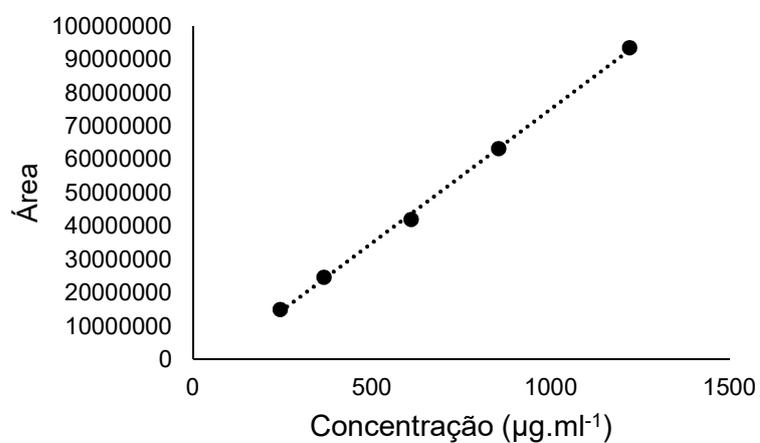
Zenkevich, I. G. Acids: Derivatization for GC Analysis. In: Cazes, J. Encyclopedia of Chromatography, 3rd ed., 2009.

Zobel, S., Helling, C., Ditz, R., Strube, J. Design and Operation of Continuous Countercurrent Chromatography in Biotechnological Production. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 53, n. 22, p. 9169-9185, 2014.

APÊNDICE A - Curvas de calibração do padrão octacosanol para CG-EM

Tabela A1 - Equações da reta e linearidade do padrão de octacosanol sililado

Curva de Calibração do octacosanol	r ²
$y = 80.524,8938x - 5.360.670,636$	0,9989
$y = 82.137,1376x - 7.340.032,558$	0,9965
$y = 69.167,0949x - 13.317.349,432$	0,9934

Figura A1 - Exemplo de curva analítica do padrão de octacosanol sililado

APÊNDICE B - FTIR e DSC do padrão octacosanol

Figura A2 - Espectros do FTIR do padrão de octacosanol analisado no modo ATR (—) e por transmitância (pastilha de KBr) (—), além do espectro de referência da literatura (pastilha de KBr) (Guidechem, 2021)

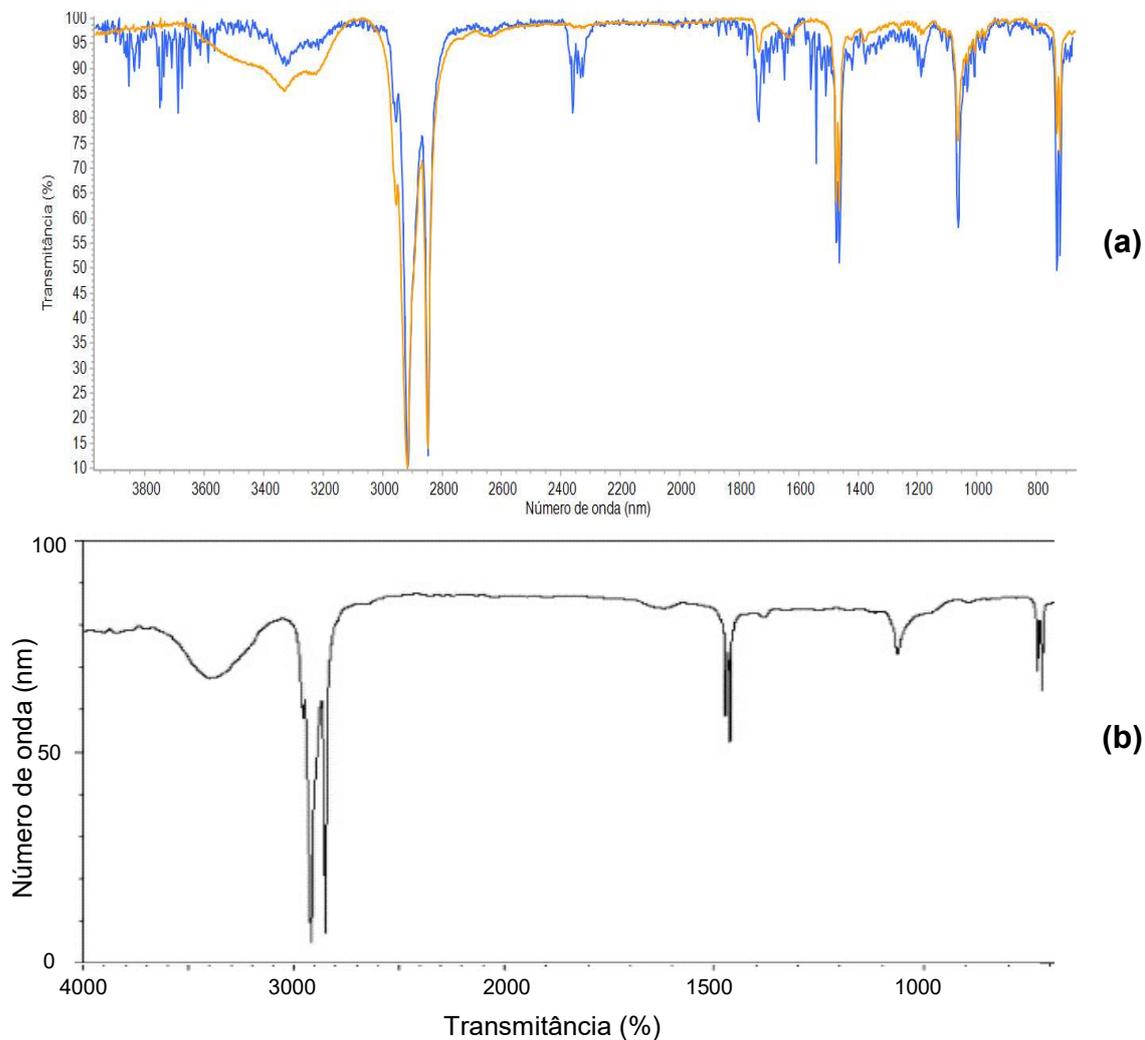
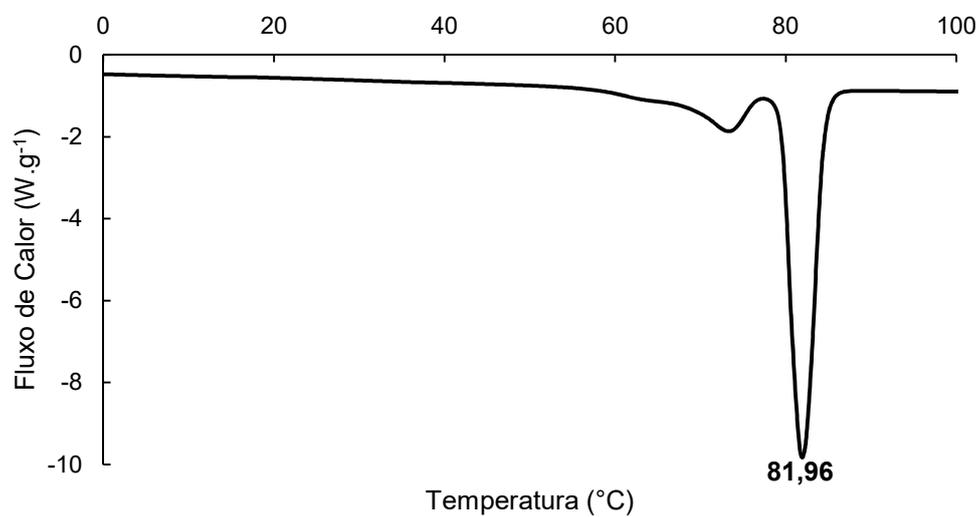


Figura A3 - DSC de fusão do padrão octacosanol



APÊNDICE C - Especificação do LesstanoL®



Product Data Sheet

Product Code: OCTA-60
Revision Date: 02/15/2013

LesstanoL Policosanol 60 (Polycosanol) Raw Material

PHYSICAL

Appearance:	Fine granular powder, white to beige.
Raw Material	Natural Vegetable Waxes from Sugar Cane (Saccharum officinarum)
Manufacturing Method	Extraction, purification and distillation of sugar cane wax raw material, with no excipients or preservatives added.
Shelf Life	Minimum 3 years
Loss on Drying	< 1.0%

TYPICAL NUTRITIONAL PROXIMATES

CHEMICAL

Arsenic(As ₂ O ₃):	< 100 ppb
Lead:	< 200 ppb
Cadmium(Cd):	< 100 ppb
Copper(Cu):	< 10 ppm
Mercury(Hg):	< 100 ppb
Alcohols (Policosanol):	90% minimum (wet basis)
1-Tetracosanol	0-10%
1-Hexacosanol	2-15%
1-Heptacosanol	0-2.0%
1-Octacosanol	55-70%
1-Nonacosanol	0-10%
1-Triacontanol	5-24%
1-Dotriacontanol	0.1-10%
1-Tetracontanol	0.1-10%

MICROBIOLOGICAL

Total Aerobic Plate Count:	< 1,000 CFU / g
Yeast:	< 100 CFU / g
Mold:	< 100 CFU / g
Coliform:	< 10 MPN
E. Coli:	Negative / g
Salmonella:	Negative / 25g
Staphylococcus aureus:	Negative / g

STORAGE

Store this raw material in a cool, dry environment protected from heat sources and sunlight.

PACKAGING

This raw material is packed in multiwall poly-barrier bags containing 1 kg., 5 kg. and 10 kg. net weights. Bags are packed in cardboard boxes or fiber drums.

Warranty: To our knowledge, the above information is accurate and reliable, but we offer no warranty other than that the product conforms to these specifications. Statements concerning use of this product are not intended to suggest suitability for any formulations or use of the product violating any patent or as a warranty of non-infringement on any product. Analytical methods and specifications are subject to change without notice. Product statements have not been evaluated by the Food and Drug Administration. These products are not intended to diagnose, treat, cure or prevent any disease.

APÊNDICE D - Espectros de massas

Figura A4 - Espectro de massas do hexacosanal ($C_{26}H_{52}O$) (362 u.m.a), com t_R : 26,860 min

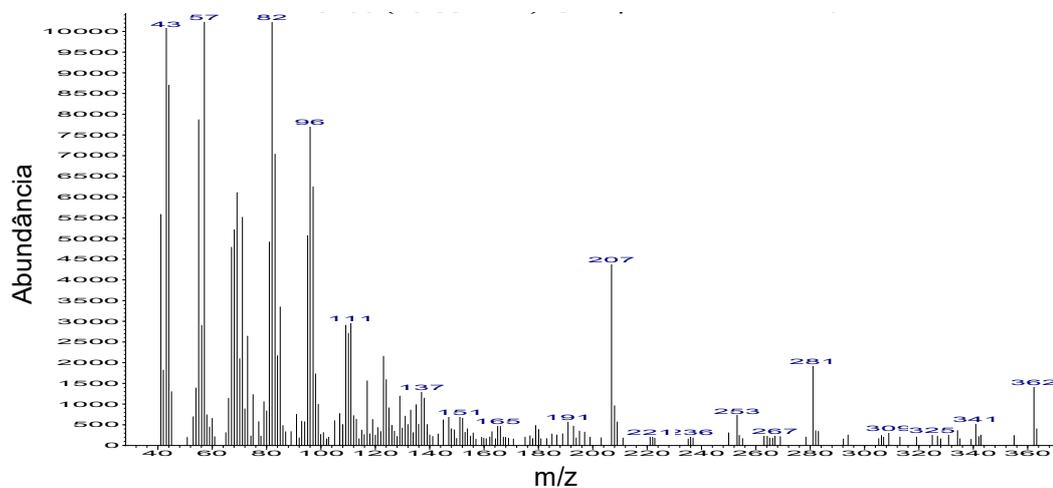


Figura A5 - Espectro de massas do octacosanal ($C_{28}H_{56}O$) (408 u.m.a) com t_R : 30,295 min

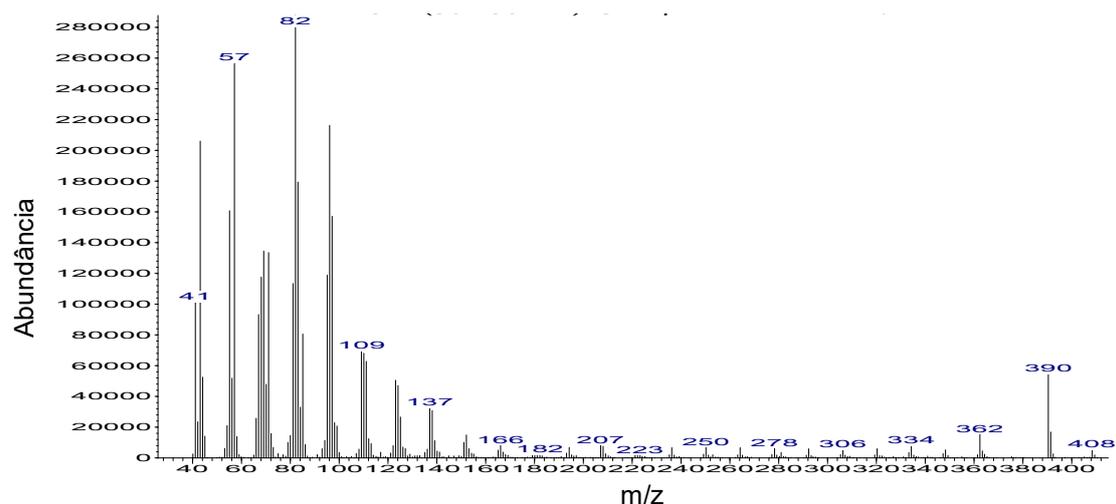


Figura A6 - Espectro de massas do triacontanal ($C_{30}H_{60}O$) (436 u.m.a.) com t_R : 33,428 min

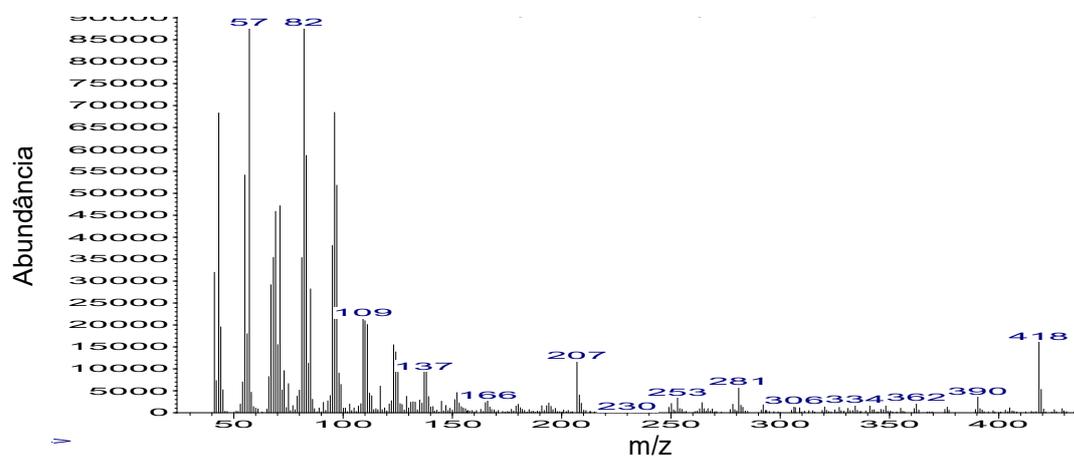


Figura A7 - Espectro de massas do dotriacontanal ($C_{32}H_{64}O$) (464 u.m.a.) com t_R : 36,494 min

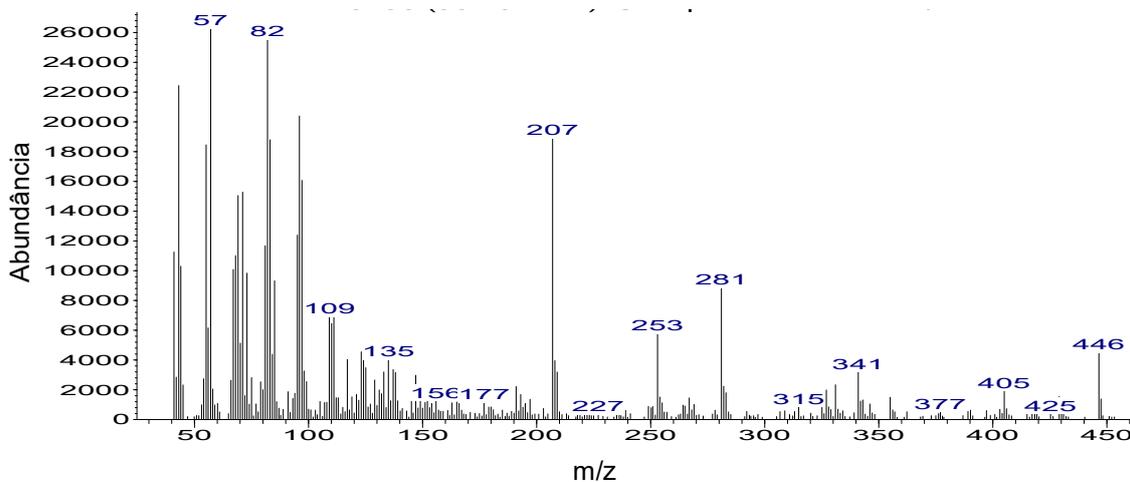


Figura A8 - Espectro de massas do tetratriacontanal ($C_{34}H_{68}O$) (492 u.m.a.) com t_R : 40,486 min

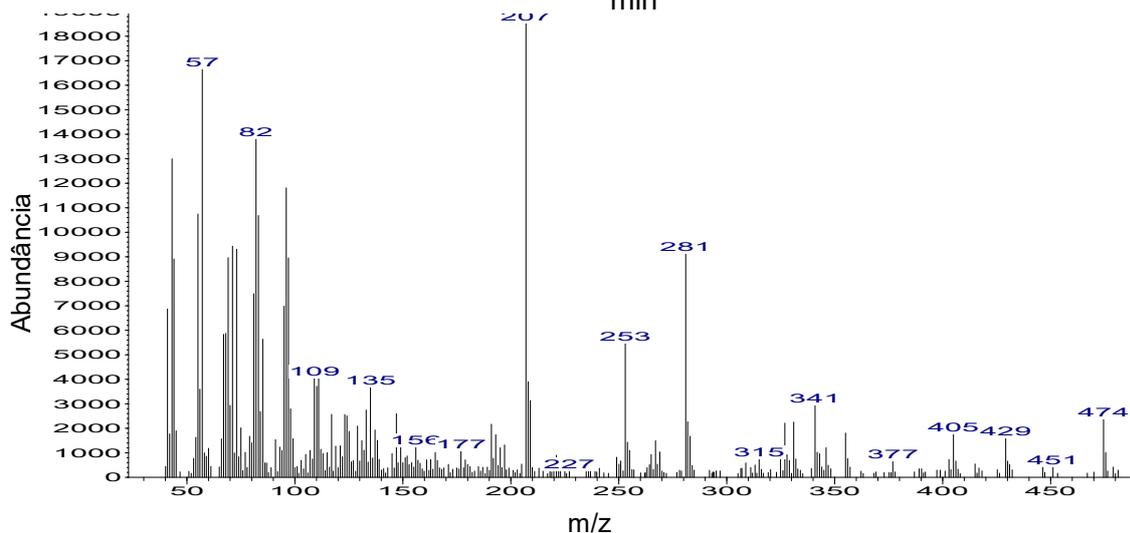


Figura A9- Espectro de massas do hexacosanol trimetilsilano ($C_{26}H_{53}OSi(CH_3)_3$) (454 u.m.a.) com t_R : 28,744 min

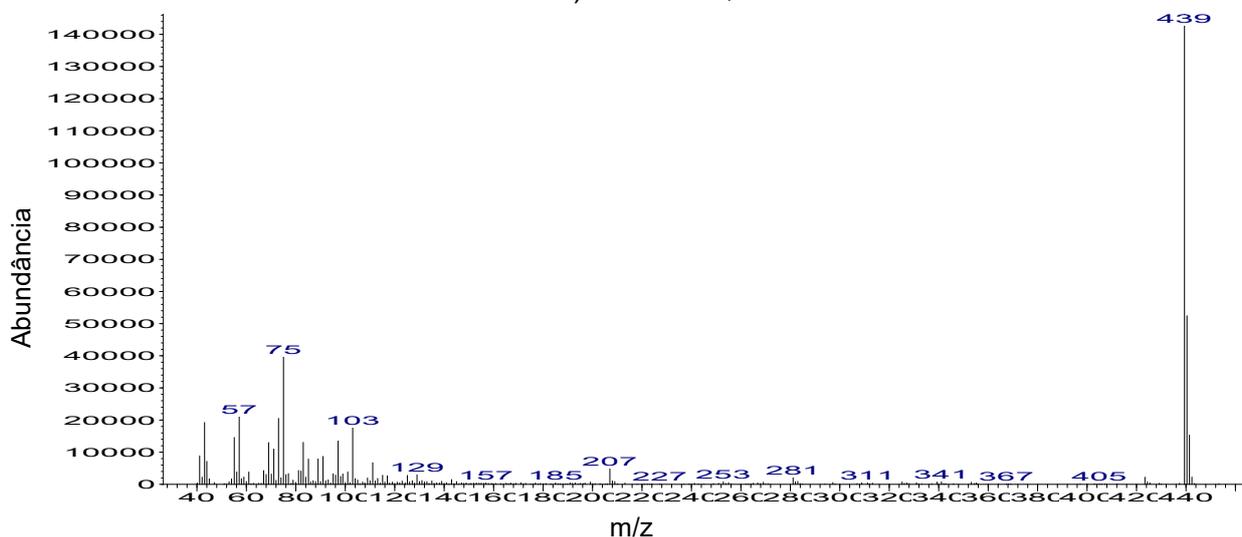


Figura A10 - Espectro de massas heptacosanol trimetilssilano ($C_{27}H_{55}OSi(CH_3)_3$) (468 u.m.a.) com t_R : 30,334 min

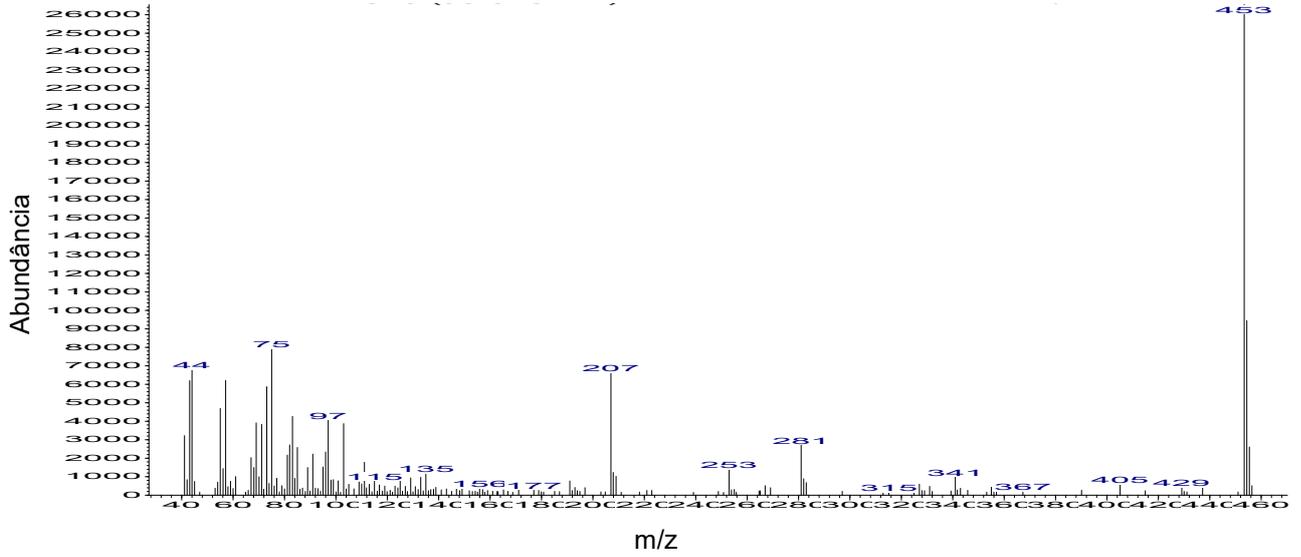


Figura A11- Espectro de massas do octacosanol trimetilssilano ($C_{28}H_{57}OSi(CH_3)_3$) (482 u.m.a.) com t_R : 31,956 min

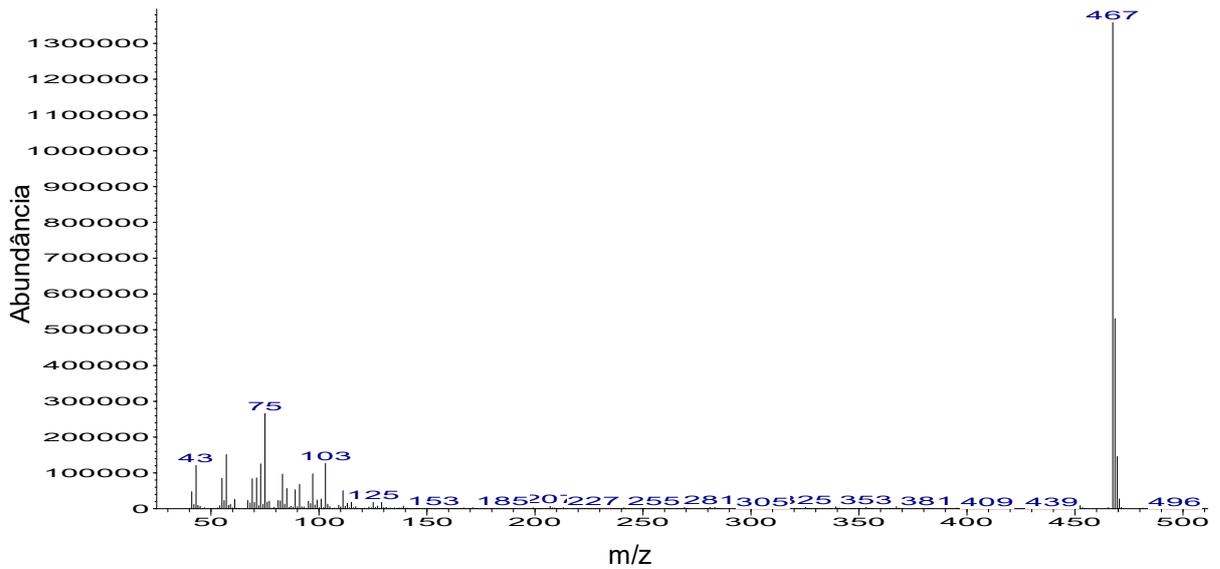


Figura A12 - Espectro de massas do octacosanol trimetilssilano obtido da biblioteca NIST-11

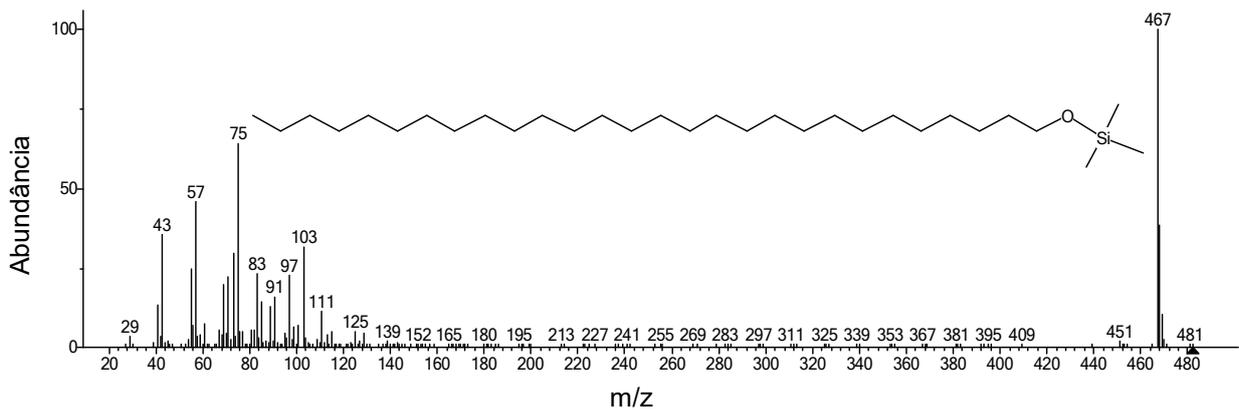


Figura A13 - Espectro de massas do triacontanol trimetilssilano ($C_{30}H_{61}OSi(CH_3)_3$) (510 u.m.a.) com t_R : 34,866 min

