

IDENTIFICAÇÃO DE TERPENOS E FITOESTERÓIS PROVENIENTES DA VINHAÇA

Yussra Abdul Ghani¹
Mateus Abner da Silva²
Renata Colombo³

RESUMO

A vinhaça é um efluente produzido em larga escala no setor sucroalcooleiro e tem sido aproveitada na fertirrigação devido ao seu elevado teor de nutrientes. No entanto, o alto teor de matéria orgânica presente nesse efluente faz com que sua aplicação no solo de forma indiscriminada seja nociva à fauna e à flora. A matéria orgânica presente na vinhaça é composta basicamente por metabólitos secundários. Esses metabólitos são amplamente utilizados como insumos ou princípios ativos em diversos setores industriais e os processos de produção desses compostos atualmente são de difícil controle e/ou geram algum tipo de impacto ambiental. Dessa forma, o desenvolvimento de processos de produção desses compostos por técnicas sustentáveis e ambientalmente mais corretas é de extrema valia. Neste trabalho foi realizada a investigação acerca dos terpenos

¹ Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade (EACH- USP). Contato: yussraghani@usp.br;

² Graduação em Ciências da Natureza, Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo (EACH-USP). Contato: mateus.abner.silva@usp.br.

³ Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade (EACH- USP). Contato: renatacolomb@usp.br.

e fitoesteróis presentes na vinhaça visando à possibilidade de reaproveitamento desse efluente como matéria-prima para a obtenção desses metabólitos de interesse comercial. A investigação focou nos fitoesteróis presentes na composição de alimentos funcionais comerciais à base de fitoesteróis e em terpenos apolares. Análises de frações hexânicas da vinhaça (obtida a partir da extração líquido-líquido) e de um alimento funcional comercial foram realizadas por cromatografia líquida (CLAE UV/vis). Os resultados mostraram que a vinhaça e o alimento funcional possuem perfis cromatográficos muito similares, sugerindo a presença dos fitoesteróis campesterol, estigmasterol e β -sistosterol na vinhaça. Uma comparação do perfil cromatográfico obtido para a vinhaça com os dados cromatográficos de padrões de terpenos, disponíveis na literatura, sugere também a presença dos terpenos amirina, betulina, ácido betulínico, ácido oleanólico e ácido ursólico na vinhaça. Esses resultados demonstram o potencial de uso desse efluente para gerar produtos de valor agregado com ganhos ambientais significativos.

Palavras-chave: vinhaça, terpenos, fitoesteróis, cromatografia

IDENTIFICATION OF TERPENES AND PHYTOSTEROLS FROM VINASSE

Abstract

Vinasse is a large-scale effluent of the sugar-ethanol industry that has been used in fertirrigation due to its high nutrients levels. However, the high level of organic matter makes the indiscriminate disposal of vinasse in soil harmful to fauna and flora. The organic matter present in vinasse consists basically of secondary metabolites. These metabolites are widely used as inputs or active ingredients in several industrial sectors and the production processes of these compounds are currently difficult to control and/or generate some kind of environmental impact. Thus, the development of the production processes of these metabolites by sustainable and environmentally friendly techniques is very important. This work has investigated the terpenes and phytosterols present in the vinasse as a contribution to reusing this effluent as raw material to obtain these metabolites of commercial interest. The research has focused on phytosterols present in the composition of commercial phytosterol-based functional foods and non-polar terpenes. Analysis of hexane fractions of vinasse (obtained from liquid-liquid extraction) and a commercial functional food were performed by Liquid Chromatography (HPLC-UVIS). The results have shown that the vinasse and the functional food have similar chromatographic profiles, suggesting the

presence of the campesterol, stigmasterol and β -sistosterol phytosterols in the vinasse. A comparison of the chromatographic data obtained for vinasse with terpene standards data, available in the literature, also suggests the presence of the amyryne, betulin, betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid terpenes in the vinasse. These results demonstrate the potential use of this effluent to generate value added products with significant environmental gains.

Keywords: Vinasse, terpenes, phytosterols, cromatography

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o líder na fabricação de etanol, proveniente da cana (LIMA; CASTRO, 2016). Embora a produção de etanol e derivados a partir desta biomassa seja considerada ambientalmente adequada, uma quantidade significativa de resíduos é gerada ao final do processo. Um desses resíduos é a vinhaça (também chamada de vinhoto, restilo, calda ou garapão), gerada durante a etapa de destilação do etanol (ZOLIN, 2011; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; GEMTOS, 1999; DIAS et al. 2015). De acordo com Moraes, Zaiat e Bonomi (2015) e Dias et al. (2015), a quantidade de vinhaça gerada no final da produção do etanol está diretamente relacionada à tecnologia utilizada nesse processo, estimando-se que a cada litro de etanol produzido são gerados em média 10 a 18 litros desse efluente. Segundo dados da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), na safra de 2017/2018 o Brasil produziu cerca de 27,859 bilhões de litros de etanol, o que implicou em uma produção estimada de vinhaça em torno de 279 a 502 bilhões de litros (UNICA, 2018).

Devido às potencialidades orgânicas e minerais da vinhaça, como o elevado teor de nutrientes e matéria orgânica, a principal forma de descarte racional e aproveitamento desse efluente é na fertirrigação com vinhaça *in natura*. No entanto, algumas características como a elevada acidez e o alto teor de matéria orgânica (que acarreta altos índices de demanda bioquímica de oxigênio, se atingir corpos d'água) fazem com que a vinhaça possua alto poder poluidor (cerca de cem vezes mais poluente que o esgoto doméstico), sendo nociva à fauna e à flora (MARINHO et al. 2014; ALVES et al. 2015). Dessa forma, tanto sua aplicação como fertilizante quanto sua deposição em valas de contenção (quando mal projetadas e geridas) acarretam sérios problemas para o solo e a água, podendo provocar a salinização do solo e a contaminação de lençóis freáticos devido a lixiviação e/ou percolação desse efluente (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FREIRE; CORTEZ, 2000). Além disso, a vinhaça é responsável pela liberação

de gases de efeito estufa, como óxido nitroso, que é 300 vezes mais efetivo que dióxido de carbono em causar o aquecimento global (SILVEIRA, 2015; CARMO et al., 2013).

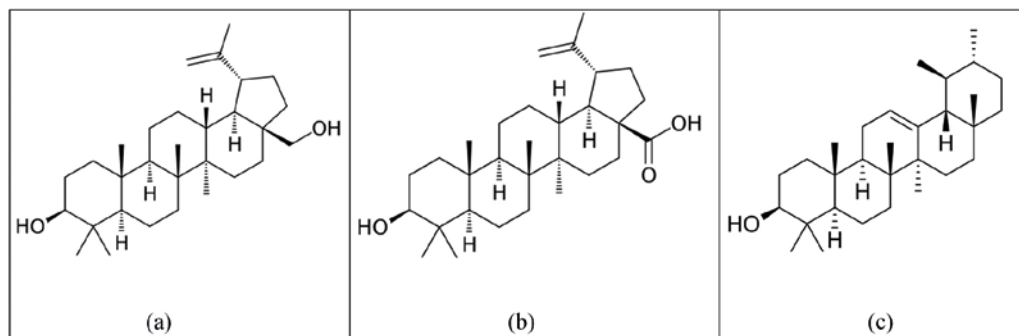
Nos últimos anos, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre a aplicabilidade da vinhaça, visando especialmente a sua caracterização e o desenvolvimento de tecnologias para degradação da matéria orgânica (LYRA, 2003; GIACHINI; FERRAZ, 2009; ANDRADE, 2017; NETO, 2016; DIAS et al., 2015). No entanto, uma alternativa à degradação dessa matéria orgânica é o seu aproveitamento, visto que é constituída de compostos de amplo interesse e aplicação industrial.

Os metabólitos secundários são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das células vegetais, que auxiliam na capacidade de sobrevivência da espécie, desempenhando funções ecológicas importantes, como defesa contra predadores e atrativos para polinizadores (aroma, sabor). Alguns desses metabólitos apresentam efeito sobre sistemas biológicos (provocando reações farmacológicas ou efeitos toxicológicos em humanos e animais), sendo considerados bioativos. Essa característica permite usá-los como insumos ou princípios ativos em diferentes setores industriais, como nos setores alimentício, farmacêutico, de cosméticos, de agrotóxicos, de pigmentos, entre outros (BERNHOF, 2010; AZMIR et al., 2013).

Dentre os compostos bioativos de plantas estão os terpenos, uma das classes de compostos orgânicos que compreende o maior número de substâncias (CROTEAU et al., 2000). Possuindo fórmula geral isoprênica (C_5H_8), os terpenos são hidrocarbonetos classificados de acordo com o número de átomos de carbono presentes em sua estrutura: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos, substâncias compostas por 5, 10, 15, 20, 30 e 40 átomos de carbono, respectivamente, e politerpenos, compostos com mais de 40 átomos de carbono (IUPAC, 1997; HARBONE; PALO; ROBBINS, 1991). Um exemplo de triterpeno bioativo é a betulina (lup-20(29) ene- 3β , 28 -diol), utilizada como matéria-prima para a produção de polímeros e precursora do ácido betulínico. Essas substâncias possuem propriedades anti-inflamatórias, antimaláricas, atividade anti-HIV e citotóxica para vários tipos de tumores cerebrais (SAMI et al., 2006). Outros triterpenos que podem ser citados são a friedelina, componente de alguns fármacos antiúlcera (FARIAS, 1999); a taraxerona, usada como antibacteriano na cura de várias infecções (PRASAD; IZAM; KHAN, 2012); a β -amirina, que tem sido avaliada como potente substância antimicrobiana e anti-inflamatória (VÁZQUEZ;

PALAZON; OCAÑA, 2012); e a sawamiletina, a arundoina e a cilindrina, que possuem diversas aplicações nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica (TAYLOR, 2000; NUISSIER et al., 2002) (Figura 1).

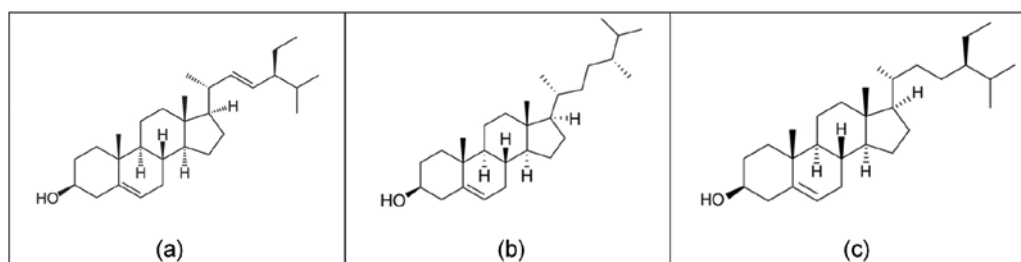
Figura 3.1 – Estrutura química da betulina (a), ácido betulínico (b) e β -amirina (c).



Fonte: Adaptado de Wu et al. (2011).

Dentre os esteróis, o campesterol, o estigmasterol e o β -sitosterol (Figura 3.2) são exemplos de fitoesteróis (esteróis provenientes de plantas) de grande aplicação na indústria farmacêutica, com a função de diminuir a absorção de colesterol pelo organismo, além de possuírem atividades anti-inflamatórias, antiulcerativas, antibacterianas e antitumorais (LEE et al., 2018). Esses fitoesteróis estão presentes em um grande número de produtos comerciais, entre eles o Collestra[®], um alimento funcional comercializado pela empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. (ACHE, 2013; KHALID, 2011; ROSS, 2007; SAMI, 2006).

Figura 3.2 – Estrutura química do estigmasterol (a), do campesterol (b) e do β -sitosterol (c).



Fonte: Adaptado de Lee et al. (2018).

Os processos industriais atuais envolvidos na obtenção dessa classe de metabólito secundário apresentam potenciais riscos ao meio ambiente, como a redução e/ou extinção de espécies vegetais (FREIRE, 2004) e o uso de reagentes derivados de petróleo altamente poluentes (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO,

2006). Devido ao seu amplo uso em diversos produtos comerciais, vários estudos e patentes vêm sendo publicados com alternativas sustentáveis para obtenção desses compostos (ROHM; HASS COMPANY, 2005; JIMENEZ-GONZÁLEZ, 2011; KLOSKOWISK, 2007; KRISTALA, 2008; BRASKEM, 2015; UNIVERSITY OF PISTTSBURG, 2007; WANG, 2015). Do ponto de vista ambiental, obter esses compostos utilizando como fonte os resíduos agroindustriais é uma alternativa que vem se mostrando promissora. Pesquisas evidenciam a presença desse grupo de compostos orgânicos em diferentes plantas, incluindo a cana-de-açúcar, em que já foram encontrados em várias partes, como no caule, na folha, no bagaço e na casca (ROSS, 2007; KHALID; SIDDIQUI, 2011; DEL RIO et al., 2015). Estudos mostram, ainda, a presença desses compostos nos derivados de cana, como a cera da casca e a cachaça (ATTARD et al., 2015; AQUINO, 2013), mostrando o potencial de eles estarem presentes também nos resíduos da cana, como a vinhaça.

Nos últimos anos, os novos processos industriais desenvolvidos vêm tentando agregar o conceito de processo verde. Incluem-se nessa categoria os processos que priorizam a redução ou eliminação de resíduos tóxicos, bem como o uso de insumos menos agressivos ao meio ambiente. Uma técnica que vem de encontro a esse princípio é a cromatografia, um método de separação que pode ser empregado no processo industrial para o isolamento e obtenção de compostos a partir de misturas como a vinhaça e ainda pode ser utilizado como método de análise qualitativo e quantitativo, auxiliando no controle de qualidade da produção desses compostos (LANÇAS, 2009; COLLINS, 2006). Dentre as técnicas de cromatografia disponíveis, a cromatografia líquida vem sendo empregada como alternativa verde nos setores industriais, pois além de gerar pequenas quantidades de resíduos durante o processo de produção e/ou análise (em relação a outros processos) é compatível com materiais pouco tóxicos, como resinas, água, álcool e outros solventes (PŁOTKA et al., 2013). Dentro desse contexto, o presente estudo utilizou a cromatografia líquida com intuito de realizar uma investigação para demonstrar a possível existência de fitoesteróis e terpenos na vinhaça, visando determinar o potencial desse efluente como matéria-prima para a obtenção de substâncias de interesse e valor comercial agregado.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Materiais e reagentes

Para esse estudo foram utilizadas amostras de vinhaça da safra 2016/2017, proveniente da Usina São João (Araras – SP) e de um produto comercial a base

de fitoesteróis (Collestra[®], Aché Laboratórios Farmacêuticos, Guarulhos – SP). Para a preparação das amostras e nas análises cromatográficas foi utilizada água ultrapura, obtida pelo sistema de purificação de água Megapurity (resistividade de 18.2 MΩ cm) da marca Millipore (Bedford, MA, USA). Foram utilizados também os reagentes etanol e hexano, ambos grau P.A. de procedência Qhemis; acetato de amônio, grau P.A., e ácido fórmico de procedência Sigma-Aldrich; acetonitrila e metanol, ambos grau HPLC de procedência J. T. Baker. Foram utilizados, ainda, membrana de seringa 22 µm, Millex – GV da Millipore.

3.2.2 Preparo das amostras de vinhaça e Collestra[®]

Os terpenos apolares e os fitoesteróis da vinhaça foram extraídos empregando a técnica de extração líquido-líquido, conforme descrito na literatura (LOPEZ; GÓMEZ, 2000; DE OLIVEIRA et al., 2006). Uma alíquota de 30 ml de vinhaça foi adicionada a 10 ml de hexano; a mistura foi agitada brandamente e, em seguida, deixada em repouso até completa separação das fases. A fração hexânica foi removida da mistura e armazenada. Na fração aquosa de vinhaça resultante da extração foi adicionado novamente 10 ml de hexano, e repetiu-se todo o processo descrito por mais duas vezes. As três frações hexânicas obtidas foram reunidas em uma única fração, o volume foi reduzido em banho-maria a 60 °C a cerca de 3 ml e as frações foram armazenadas ao abrigo da luz, sob refrigeração, até o momento das análises.

A amostra do alimento funcional Collestra[®], utilizado como padrão para a comparação dos fitoesteróis presentes na vinhaça, foi preparada solubilizando-se 0,01 g do produto comercial em 50 µl de hexano. Tanto a fração hexânica de vinhaça quanto a solução de Collestra[®] foram diluídas com etanol na proporção 1:1 v/v, filtradas em membranas de 22 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3 Análise por cromatografia de alta eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas empregando-se um cromatógrafo líquido UPLC da marca Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por duas bombas, modelo LC-20AD XR; injetor automático, modelo SIL-20AXR; forno, modelo CTO-20A; módulo de comunicação, modelo CBM-20A; e detector UVVis/DAD, modelo SPD-M20A. Um método cromatográfico foi desenvolvido para a separação e detecção dos terpenos e fitoesteróis presentes na vinhaça e no Collestra[®]. Para o desenvolvimento da metodologia, diferentes condições foram avaliadas, incluindo quatro diferentes colunas cromatográficas:

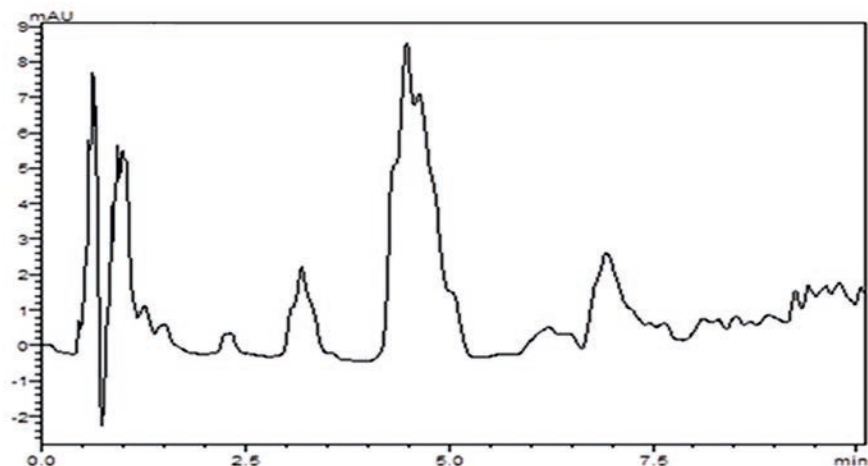
Shim-pack XR-ODS II (100 mm x 3,0 mm x 2,2 μm), Shim-pack GIST C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm), Shim-pack VP – ODS de dimensões (150 mm x 4,6 mm x 2,2 μm) e SupelcosilTMLC – 18 de dimensões (25 cm x 2,1 mm x 5 μm); dois fluxos (0,8 e 1,0 mL min⁻¹); e diferentes fases móveis constituídas por água ultrapura, tampão acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ como fase aquosa e metanol, acetonitrila e metanol com 0,1% de ácido fórmico como fase orgânica. Diferentes modos de eluição também foram investigados (modo gradiente e isocrático). A temperatura do forno em todas as análises foi de 30 °C.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Otimização do método cromatográfico

A otimização do método de análise foi realizada usando o alimento funcional Collestra[®]. Inicialmente, utilizou-se uma coluna Shim-pack XR-ODS II, água (A) e acetonitrila (B) como fase móvel, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e seis gradientes de eluição. Nenhuma das condições testadas apresentou separação dos compostos e/ou resolução dos picos satisfatórios, conforme mostrado na Figura 3.3.

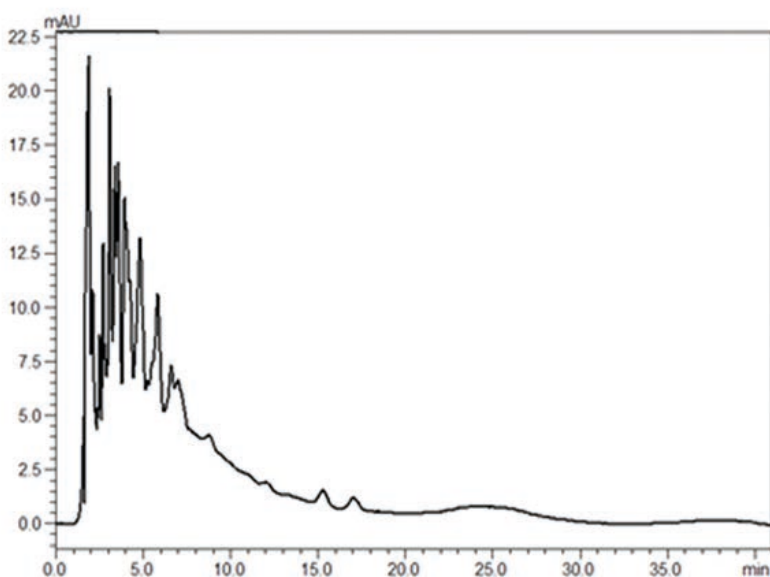
Figura 3.3 – Cromatograma CLAE-UV da amostra de Collestra[®] utilizando água (A) e acetonitrila (B) e gradiente: 0 a 5 min: 50% B; 5 a 7 min: 50% – 60% B; e 7 a 10 min: 80% B, fluxo 0,8 mL min⁻¹.



Tendo como base o gradiente que apresentou melhores resultados com a coluna Shim-pack XR-ODS II (0 a 5 min: 50% B; 5 a 7 min: 50% – 60% B; e 7 a 10 min: 80% B), foram feitos testes com as demais colunas cromatográficas

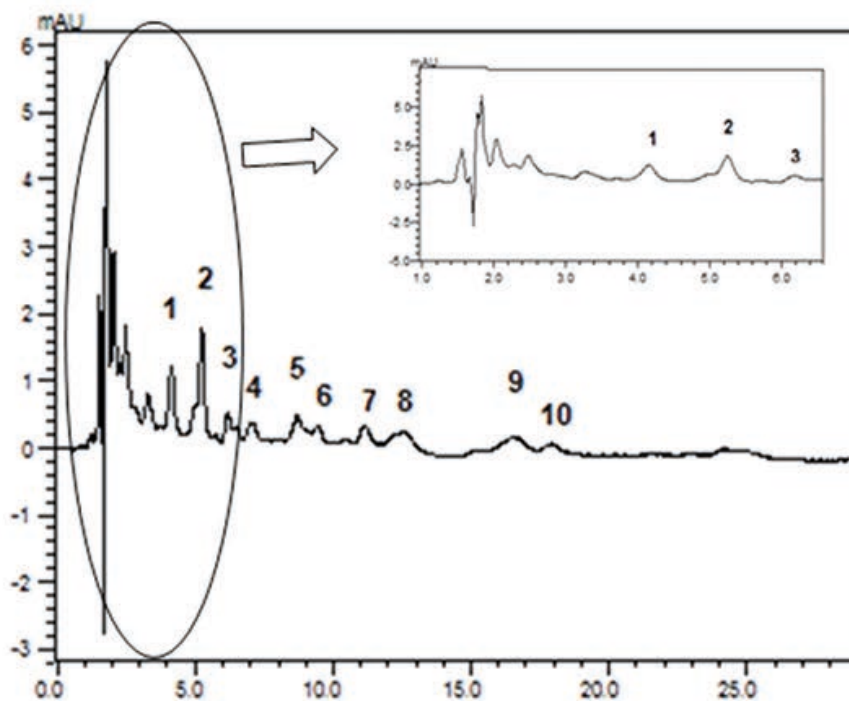
(Shim-pack GIST C18, Shim-pack VP – ODS e Supelcosil™LC – 18). Entretanto, também não houve separação e/ou resolução satisfatórias com as condições empregadas, tendo-se apenas resultados ligeiramente melhores com a coluna Shim-pack GIST 18 em comparação às demais. Dessa forma, utilizando-se essa coluna, foram testadas alteração do fluxo (1 ml min^{-1}), novas fases móveis (água/metanol; acetato de amônio $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ /acetonitrila e água/metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico) e diferentes programações de eluição. Das condições avaliadas, a fase móvel composta por água/metanol e o fluxo de 1 ml min^{-1} foi a que apresentou separação mais eficiente para alguns dos compostos e melhor resolução dos picos. Testaram-se, então duas, condições relatadas em literatura para terpenos (WU et al., 2011; LIN et al., 2008), contendo como fase móvel água/metanol e água/metanol acidificado com 0,1 % ácido fórmico, ambos no modo isocrático (97% e 80% de metanol, respectivamente). Essas análises foram as que apresentaram os resultados mais promissores quanto a separação e resolução dos compostos presentes no alimento funcional Collestra® e, portanto, foram empregadas para as análises da fração hexânica de vinhaça. Na eluição com 97% de metanol houve a separação de diversos compostos, porém todos foram eluídos no começo do gradiente (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Cromatograma da análise por CLAE-UV/DAD da fração hexânica de vinhaça. Condições cromatográficas: coluna Shim-Pack GIST 18 (150 mm x 4,6 mm x $5 \mu\text{m}$), fase móvel metanol e água no modo de eluição isocrático (97:3 v/v) e fluxo de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.

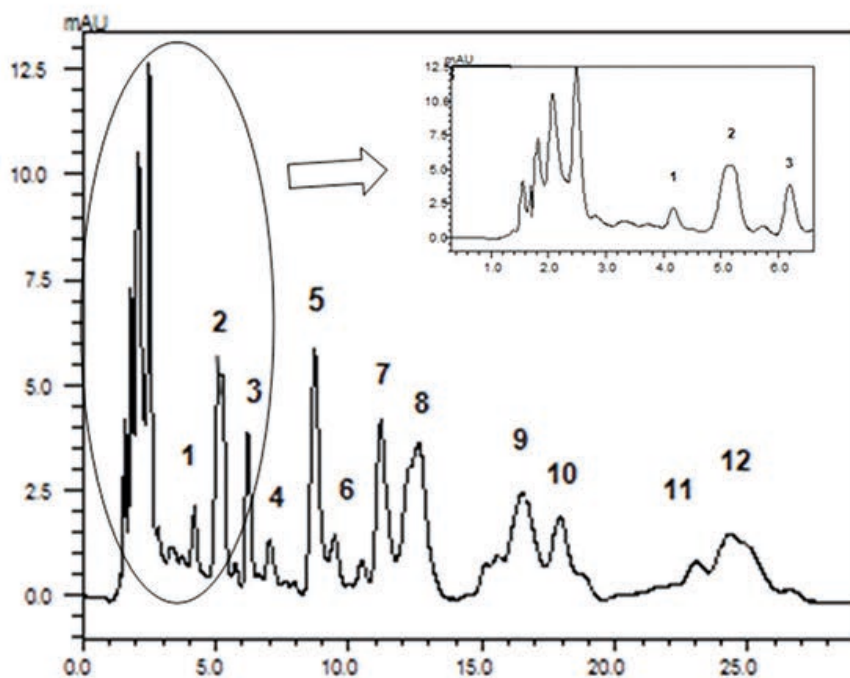


Na eluição com 80% de metanol houve a separação de diversos compostos com uma boa resolução dos picos, tanto no alimento funcional Collestra® (Figura 3.5 (a)) quanto na vinhaça (Figura 3.5 (b)).

Figura 3.5 – Cromatograma da análise por CLAE-UV/DAD do alimento funcional Collestra® (a) e da fração hexânica de vinhaça (b). Condições cromatográficas: coluna Shim-pack GIST 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm), fase móvel metanol com 0,1% de ácido fórmico e água no modo de eluição isocrático (80:20 v/v), fluxo de 1,0 ml min⁻¹.



(a)



(b)

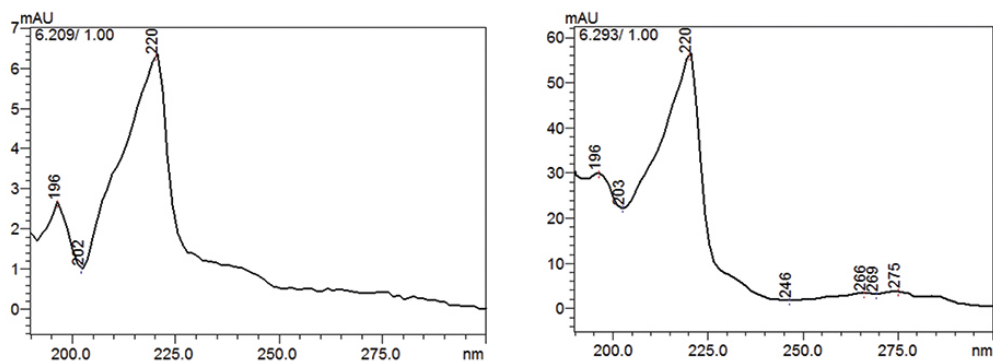
3.3.2 Perfil de fitoesteróis da vinhaça

A análise CLAE-UV da fração hexânica da vinhaça mostrou a presença de diversos compostos, sendo seu perfil cromatográfico muito semelhante ao do alimento funcional Collestra® (Figura 3.5).

O alimento funcional Collestra® é composto por cápsulas contendo 650 mg de ésteres de fitoesteróis de origem vegetal, extraídos de soja (60%-70%), canola (20%-30%), girassol (5%-10%) e milho (1%-5%). Diversos tipos de fitoesteróis estão presentes em plantas, porém o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol são os mais abundantes (ACHE, 2013). Comparando os tempos de retenção, foi possível observar que todos os compostos provenientes do Collestra® apresentaram correlatos na amostra de vinhaça, sugerindo que ambas as amostras possuem os mesmos fitoesteróis e que a vinhaça provavelmente contém β -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Observou-se, ainda, que a fração hexânica de vinhaça apresenta picos mais abundantes do que os do Collestra®, sugerindo que nas proporções que foram preparadas as amostras esses fitoesteróis na vinhaça estão em maiores concentrações que na amostra Collestra® (Figura 3.5).

Comparando-se os espectros de absorção molecular na região do ultravioleta (UV) dos picos observados em ambas as amostras, tem-se que vários deles apresentaram semelhanças entre eles os dos picos 3, 6 e 7. Os picos 3 com tempo de retenção (Tr) de 6,2 min. nas duas amostras apresentaram bandas características de fitoesteróis, com absorbância máxima em torno de 220 nm (Figura 3.6).

Figura 3.6 – Espectro UV do pico 3: (a) padrão Collestra® e (b) fração hexânica de vinhaça.



Os picos com Tr = 9,4 min (pico 6) e Tr = 11,1 min (pico 7) nas amostras de Collestra® e vinhaça também apresentaram espectros na região do UV semelhantes entre si, com banda de máxima absorção característica de fitoesteróis, ou seja, em torno de 200 nm (Figuras 3.7 e .38, respectivamente).

Figura 3.7 – Espectro UV do pico 6: (a) padrão Collestra® e (b) fração hexânica de vinhaça.

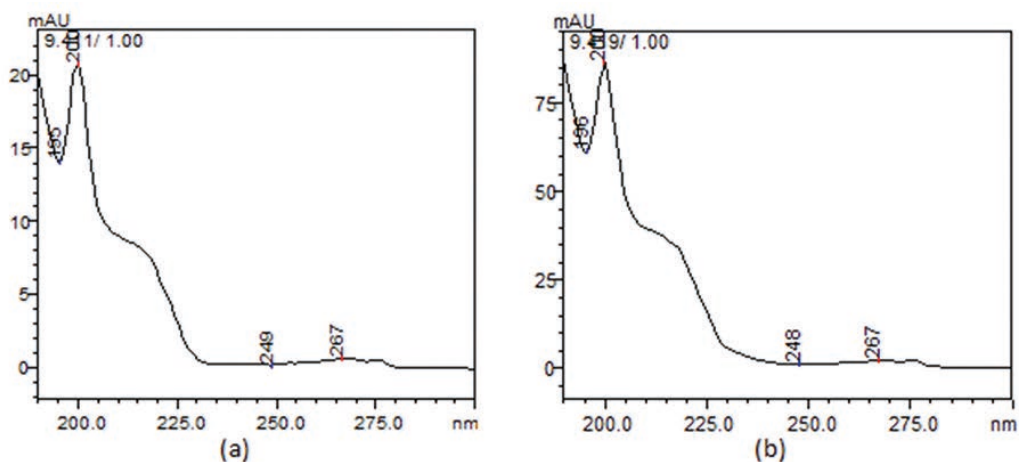
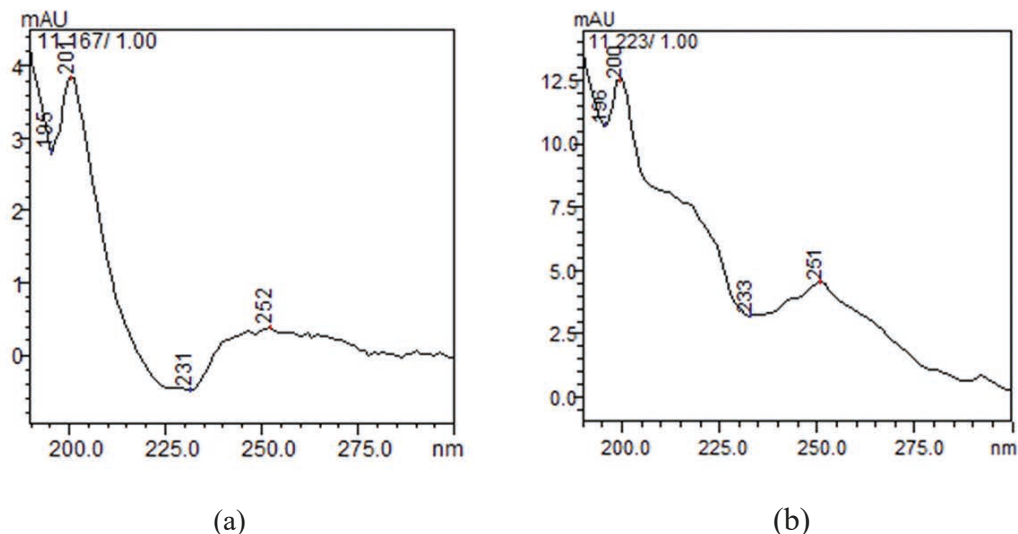
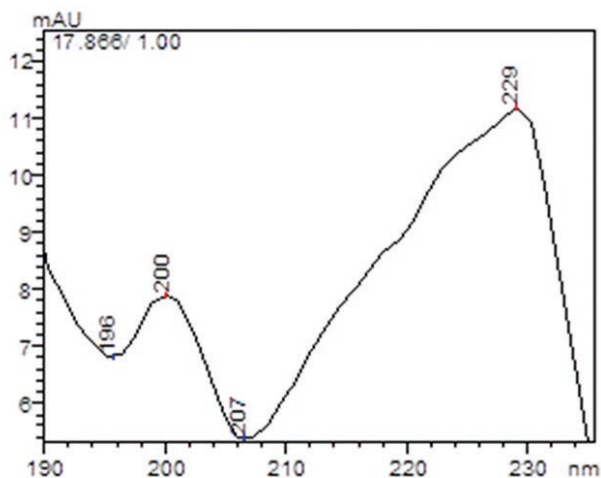


Figura 8 – Espectro UV do pico 7: (a) padrão Collestra® e (b) fração hexânica de vinhaça.



De acordo com Lee et al. (2015), o campesterol e o estigmasterol apresentam máximos de absorção na região do UV em aproximadamente 254 nm e 235 nm, respectivamente. Dos picos observados na amostra de Collestra® e na vinhaça, o pico 7 ($T_r = 11,1$ min.) apresentou espectro com características próximas às apresentadas na literatura, com absorções em 251 nm – 252 nm, sugerindo que esse composto pode se tratar do campesterol (Figura 3.8). O pico 10 ($T_R = 17,8$ min.) apresentou máximo de absorção na região de 230 nm, podendo ser um indicativo de estigmasterol (Figura 3.9).

Figura 3.9 – Espectro UV do pico 10 da fração hexânica de vinhaça.



3.3.3 Perfil de triterpenos na vinhaça

Além da investigação acerca dos fitoesteróis, foi realizada uma investigação acerca da presença de triterpenos na vinhaça. Essa investigação foi realizada reproduzindo-se condições cromatográficas de análise de terpenos descritas na literatura (WU et al., 2011; LIN et al., 2008).

Aplicando a metodologia descrita por Wu et al. (2011), na qual utilizou-se metanol e água como fase móvel, eluição no modo isocrático (97:3 v/v) e coluna cromatográfica compatível com a utilizada neste estudo (Shim-pack GIST 18), observou-se para a fração hexânica de vinhaça a presença de dois picos (Figura 3.4) com tempos de retenção $T_R = 15,34$ e $17,24$. Esses picos apresentam tempo de retenção e espectros UVvis semelhantes ao do triterpeno amirina ($T_R = 16,2$), relatado por Wu et al. (2011) em suas análises.

Na metodologia descrita por Lin et al. (2008), na qual foi utilizada metanol acidificado a 0,1% com ácido fórmico e água como fase móvel, no modo de eluição isocrático (80:20 v/v) e coluna também compatível com a utilizada neste estudo, observou-se para a fração hexânica da vinhaça picos com tempos de retenção semelhantes a de outros terpenos. De acordo com Lin et al. (2008), os compostos betulina, ácido betulínico, ácido oleanólico e ácido ursólico apresentaram tempos de retenção igual a 17,0; 21,5; 24,0; e 25,8 min., respectivamente. Na vinhaça, tempos de retenção semelhantes foram observados para os picos 9 ($T_R = 17$ min.); 11 ($T_R = 24$ min.); e 12 ($T_R = 25,8$ min.), sugerindo a presença da betulina, ácido oleanólico e ácido ursólico (Figura 3.5 (b)). Os espectros UVvis também foram comparados apresentando perfis de absorção muito próximos.

3.4 CONCLUSÃO

A comparação dos dados cromatográficos e espectroscópicos das frações hexânicas de vinhaça e do alimento funcional Collestra® sugere que a vinhaça pode conter em sua composição os mesmos fitoesteróis empregados no produto comercial, sendo eles o campesterol, o estigmasterol e o β -sigmasterol. Além dos fitoesteróis, uma comparação dos dados obtidos neste estudo com os publicados em literatura indicou também que a vinhaça pode conter outros terpenos, como amirina, betulina, ácido oleanólico e ácido ursólico. Os resultados aqui apresentados deverão ser confirmados por meio de novos estudos cromatográficos empregando detector de massas e outras técnicas necessárias para elucidar as estruturas dos fitoesteróis, terpenos e outros metabólitos de interesse.

Portanto, o presente estudo demonstra o grande potencial da vinhaça como possível fonte desses metabólitos, com ganhos ambientais significativos, pois estará reaproveitando de forma mais nobre esse efluente, além de evitar a extinção de certas espécies vegetais e reduzir o uso de derivados de petróleo altamente poluentes, que são atualmente as principais fontes de obtenção desses compostos.

3.5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2016/14564-1, pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIA

ACHÊ. Bula do suplemento alimentar COLLESTRA. 2013. Disponível em: <<https://www.ache.com.br/arquivos/Collestra.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2019.

ALVES, P. R. L. et al. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of the Total Environment**, v. 526, p. 222-232, 2015.

AQUINO, A.J. **Análise dos compostos flavorizantes da cana-de-açúcar e otimização da aplicação de extratos ricos em β - glicosidades para liberação de aroma na produção de aguardente de cana.** 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2013.

ANDRADE, L. C. L. **Novo paradigma da utilização da vinhaça como adubo em sistemas hidropônicos.** 2017. Dissertação (Mestrado em Agronegócio e Desenvolvimento) – Faculdade de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Tupã, 2017.

ATTARD, T. M. et al. Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 95-103, 2015.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Jornal of food Engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.

BERNHOF, A. **A brief review on bioactive compounds in plants**. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway, 2010.

BRASKEM S. A. et al. **Methods of production of a terpene and a co-product**. Int. C12P5/007. E.U.A. US 20150211024 A1. 28 ago. 2013, 30 jul. 2015.

CARMO et al. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **GCB Bioenergy**, v. 5, p. 267-280, 2013.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452 p.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.

CROTEAU, R. et al. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.

DE OLIVEIRA, P. A. et al. Análise comparativa de triterpenóides de Mikaniacordifolia coletada em quatro locais diferentes. **Rev. Brasileira Ciências Farm**, v. 42, n. 4, p. 547-552, 2006.

DIAS, M. O. S. et al. Sugar cane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.

DEL RIO, J. C. et al. Lipophilic phytochemicals from sugarcane bagasse and straw. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 992-1000, 2015.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al.. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999. 821 p.

FREIRE, M. F. I. Plantas medicinais: A importância do saber cultivar. **Revista científica eletrônica agronomia**, v. III, n. 5, 2004. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/7ucemh9Yj4d-cHPw_2013-4-26-12-10-36.pdf>. Acesso em: 12 set. 2019

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 203 p.

GEMTOS, T. A.; CHOULIARAS, N.; MARAKIS, S. Vinasse rate, time of application and compaction effect on soil properties and durum wheat crop. **Journal of Agriculture and Engineering Research**, v. 73, n. 3, p. 283-296, 1999.

GIACHINI, C. F.; FERRAZ, M. V. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar- revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 3, p. 1-15, 2009.

HARBONE, J. B.; PALO, R. T.; ROBBINS, C. T. Plant defenses against mammalian herbivore. **The Chemical Basis of Plant Defense**, CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 45-60, 1991.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd. ed. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1997.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, C. et al. Key Green Engineering Research Areas for Sustainable Manufacturing: A Perspective from Pharmaceutical and Fine Chemicals Manufacturers. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 4, p. 900-911, 2011.

KHALID, M.; SIDDIQUI, H. H. Pharmacognostical Evaluation and Qualitative Analysis of *Saccharum spontaneum*(L.) Root. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 3, n. 4, p. 338-341, 2011.

KLOSKOWISK, A. et al. Modern Techniques of Sample Preparation for Determination of Organic Analytes by Gas Chromatography. **J. Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 15-38, 2007.

KRISTALA, L. J. P.; MARTIN, C. H. De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 468, 2008.

LANÇAS, F.M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **ScientiaChromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009. Disponível em: <<http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a4.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2019.

LEE, J. et al. Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in *Artemisia apiacea* by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 42, p. 297-303, 2015.

LEE, D. G. et al. High-performance liquid chromatography analysis of phytosterols in *Panax ginseng* root grown under different conditions. **Journal of ginseng research**, v. 42, n. 1, p. 16-20, 2018.

LIMA, M. P.; CASTRO, M. C. G. **A produção de cana-de-açúcar no Brasil uma análise dos impactos sócio-econômicos da implementação do complexo sucroalcooleiro no município de vicentinópolis**. Anais do seminário de pesquisa, pós-graduação, ensino e extensão de campus Anápolis de CSEH(SEPE), 2016.

LIN, L.-W. et al. Comparison with various parts of *Broussonetia papyrifera* as to the antinociceptive and anti-inflammatory activities in rodents. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 72, n. 9, p. 2377-2384, 2008.

LOPEZ, E. F; GÓMEZ, E. F. Comparison of solvents for determination of monoterpenes in wines using liquid-liquid extraction. **Chromatographia**, v. 52, n. 11-12, p. 798-802, 2000.

LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. Topossequência de solos fertilrigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol

freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 525-532, 2003.

MARINHO, J. F. U. et al. Sugar cane vinasse in water bodies: impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 110, p. 239-245, 2014.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, 2015.

NUISSIER, G. et al. Composition of sugarcane waxes in rum factory wastes. **Phytochemistry**, v. 61, n. 6, p. 721, 2002.

NETO, A. E. Estudo da arte da vinhaça. ÚNICA: Piracicaba, 2016. Disponível em <<https://docplayer.com.br/46902322-Estado-da-arte-da-vinhaca.html>> Acesso em: 10 set. 2019

PŁOTKA et al. Green chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, n. 2013, p. 1–20, 2013.

PRASAD, D. M. R.; IZAM, A.; KHAN, M. R. Jatropha curcas: Plant of medical benefits: review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 14, p. 2691, 2012.

ROHM AND HASS COMPANY, LEONARD E. BOGAN. et al. Processos para a produção de ácidos carboxílicos insaturados ou de nitrilas insaturadas. CO7C57/05; CO7C51/225. E.U.A. PI0405436-9. 10 nov. 2004, 30 ago. 2005. **Revista de propriedade Intelectual**, n. 1808, p. 78, 2005.

ROSS, I. A. **Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses**. v. 3. New York: Human Press. Springer Science & Business Media, 2007.

SAMI, A. et al. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product botulin: Review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 1, 2006.

SILVEIRA, E. Vinhaça para gerar energia. **Revista Fapesp**, v. 238, p. 68-71, 2015. Disponível em <https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2015/12/068-071_Vinhaca_238.pdf>. Acesso em: 10 set.2019

TAYLOR, A. K. From raw sugar to raw materials. **Chemical Innovation**, v. 30, n. 11, p. 45-51, 2000.

UNICA, União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2017/2018**. 2018. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/pdfHPM.php?idioma=1&tipoHistorico=4&idTabela=1984&produto=&safra=2017/2018&safraIni=&safraFim=&estado=R-S,SC,PR,SP,RJ,MG,ES,MS,MT,GO,DF,BA,SE,AL,PE,PB,RN,CE,PI,MA,-TO,PA,AP,RO,AM,AC,RR>>. Acesso em: 13 set. 2019.

UNIVERSITY OF PISTTSBURG – OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION.ERIC J. BECKMAN. PRADIP MUNSHI SILVA, H. **Composição e métodos de produção de ácidos carboxílicos aromáticos**. Int. CO7C51/00; CO7C63/04. E.U.A PI0506962-9A. 20 Jan. 2005, 26 Jun. 2007. **Revista de propriedade intelectual**, n. 1903, p. 31, 2007.

VÁZQUEZ, L. H.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities, Phytochemicals. In: Rao, V. (Ed.). **A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, p. 487-502, 2012.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, X.; ORT, D. R.; YUAN, J. S. Photosynthetic terpene hydrocarbon production for fuels and chemicals. **Plant. Biotechnology Journal**, v. 13, n. 2, p. 137-146, 2015.

WU, C. R. et al. Triterpenoid contents and anti-inflammatory properties of the methanol extracts of ligustrum species leaves. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2011.

ZOLIN, C. A. et al. Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo: I. Características do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 1, p. 22-28, 2011.

