UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE

Desenvolvimento de metodologias de extração e de análise dos ácidos orgânicos da vinhaça de cana-de-açúcar

LUIZA COATTI

São Paulo

2022

LUIZA COATTI

Desenvolvimento de metodologias de extração e de análise dos ácidos orgânicos da vinhaça de cana-de-açúcar

Versão original

Dissertação apresentada para à Escola de Artes, Ciência e Humanidades da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia

Orientadora: Profª Drª Renata Colombo

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica versão corrigida elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades,
com os dados inseridos pelo(a) autor(a)
Brenda Fontes Malheiros de Castro CRB 8-7012; Sandra Tokarevicz CRB 8-4936

Coatti, Luiza
Desenvolvimento de metodologias de extração e de anâlise dos ácidos orgânicos da vinhaça de cana-de-açúcar / Luiza Coatti; orientadora, Renata Colombo. -- São Paulo, 2022.
91 p: il.

Dissertacao (Mestrado em Ciencias) - Programa de Pós-GraduaÇão em Sistemas de Informação, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2022.
Versão corrigida

1. vinhoto. 2. ácidos carboxilicos. 3. cromatografia. 4. adsorventes. I. Colombo, Renata, orient. II. Titulo.

Nome: COATTI, Luiza.

Título: Desenvolvimento de metodologias de extração e de análise dos ácidos orgânicos da vinhaça de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada para à Escola de Artes, Ciência e Humanidades da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia

Orientadora: Profª Drª Renata Colombo

Aprovado em: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Para as mulheres que mais amei no mundo e que torcem por mim lá do céu. Eu amo vocês, Noemia e Mafalda. Para todo o sempre!

Agradecimentos

Durante os anos na pós-graduação, foi de grande amadurecimento e esse crescimento profissional foi conquistado com o apoio de muitas pessoas importantes.

Agradeço primeiramente a minha orientadora, Drª Renata Colombo, que acreditou em mim e no meu potencial, há oito anos atrás na graduação, e desde então sempre me apoiou durante todo meu percurso acadêmico. Obrigada pelos ensinamentos, as críticas construtivas, as orientações, pelos almoços, nossas conversas, por sempre estar do meu lado. Sem você esses anos não seriam possíveis. Agradeço por ser a melhor orientadora que uma orientanda poderia ter.

Agradeço minha família, principalmente aos meus irmão, a Bruna, Matheus, Gucci e Lia, pelo amor de todos esses anos. Agradeço pelo suporte que recebi e o apoio, ou até o "você consegue", que as vezes era o necessário. Amo vocês.

Agradeço ao Danilo da Conceição Santos, pelo seu amor e apoio todos esses anos, mesmo quando eu tive que passar finais de semana estudando, em congresso ou até mesmo escrevendo essa dissertação. Obrigada por sempre estar do meu lado, apoiando minhas decisões de fazer uma pós-graduação e estudar por mais anos que o planejado. Eu agradeço muito por você fazer parte da minha história de vida.

Agradeço a Milla de Araújo Almeida, Camila Passos e Yussrra Abdul Ghani pela amizade de vocês. Agradeço pelo apoio no laboratório, sempre me ajudando quando precisa de ajuda ou de algum reagente. Agradeço por todas as xícaras de café que vieram cheios de conversas e confortos quando dias que nem tudo estava tão bem. Agradeço por fazerem parte da minha vida.

Agradeço a Raíssa Ballego pela sua amizade e pelo apoio. Agradeço por me ajudar sempre que eu precisei durante todos esses anos, inclusive para este trabalho. Agradeço por nunca me abandonar e sempre pensar em mim, em todos os momentos. Agradeço por todas as lembranças incríveis que tive e terei com a nossa amizade.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório Vitor Cano, Júlio Cano, Luciana Sayuri e todos aqueles que me auxiliaram todos esses anos. Agradeço ensinamentos que tive todos os dias com vocês. Agradeço por estarem presentes nesse momento tão importante.

Agradeço a CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

Resumo

O Brasil é o maior produtor de bioetanol gerado a partir da cana-de-açúcar. A produção deste biocombustível gera, durante o processo, diversos subprodutos em larga escala, entre eles a vinhaça. O montante de vinhaça gerado varia de 9 a 17 L para cada litro de bioetanol produzido, e atualmente é empregada principalmente na fertirrigação da lavoura da cana-de-açúcar, devido a sua composição rica em nutrientes. Contudo, sua aplicação no solo é restrita devido ao seu alto teor de matéria orgânica e seu pH ácido, relacionado à presença de ácidos orgânicos. Os ácidos presentes nesse efluente são utilizados como insumos em diversos setores industriais e atualmente são produzidos a partir de processos de difícil controle e/ou que envolvem reagentes tóxicos. Em busca de um melhor aproveitamento da vinhaça, o objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias de extração e análise (qualitativa e quantitativa) dos ácidos da vinhaça. O foco do estudo foi nos ácidos já descritos na literatura como presentes na cana-de-açúcar e que possuem aplicação em setores industriais (aconítico, maleico, succínico, cítrico, malônico, tartárico, lático, oxálico, glicólico, glutâmico e oxálico). Um método por cromatografia líquida com detector ultravioleta (CLAE-UV/MS) foi desenvolvido e validado para a detecção e quantificação dos ácidos orgânicos em amostras de vinhaça. A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi utilizada para a inequívoca identificação dos ácidos.

O potencial de aplicação da resina de troca iônica Purolite A400 na extração dos ácidos identificados na vinhaça foi avaliado utilizando os modelos de isotermas de Langmuir e Freundlich. Dentre os onze ácidos monitorados, os ácidos aconítico, málico e glicólico foram os mais frequentes nas cinco amostras de vinhaça analisadas. O aconítico e o málico foram os que apresentaram maiores concentrações em todas as amostras, variando entre 0,13-12555,41 mgL^{-1}. Com relação ao estudo de adsorção dos ácidos na resina Purolite A400, o modelo de Langmuir foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais obtidos, indicando que o processo de adsorção é favorável e que a resina tem capacidade máxima de adsorção dos ácidos na faixa de 0,2 – 90,9 mgg^{-1}. Conclui-se que a vinhaça tem potencial de ser empregada como fonte alternativa de obtenção dos ácidos orgânicos e que métodos simples e que atendem aos princípios da química verde podem ser empregados satisfatoriamente para a extração e análise destes ácidos em amostras de vinhaça.

Palavras-chave: Vinhoto, ácidos carboxílicos, cromatografia, adsorventes.

Abstract

Brazil is the largest producer of bioethanol generated from sugarcane. The production of this biofuel generates, during the process, several by-products on a large scale, including vinasse. The amount of vinasse generated varies from 9 to 17 L for each liter of bioethanol produced, and it is currently used mainly in the fertigation of the sugarcane crop, due to its rich composition in nutrients. However, its application in the soil is restricted due to its high content of organic matter and its acid pH, related to the presence of organic acids. The acids present in this effluent are used as inputs in several industrial sectors and are currently produced from processes that are difficult to control and/or that involve toxic reagents. In search of a better use of vinasse, the objective of this work was to develop methodologies for extraction and analysis (qualitative and quantitative) of vinasse acids. The focus of the study was on the acids already described in the literature as present in sugarcane and which have application in industrial sectors (aconitic, maleic, succinic, citric, malonic, tartaric, lactic, oxalic, glycolic, glutamic and oxalic). A liquid chromatography method with ultraviolet detector (HPLC-UV/MS) was developed and validated for the detection and quantification of organic acids in vinasse samples. The technique of liquid chromatography coupled to mass spectrometry was used for the unequivocal identification of the acids.

The application potential of Purolite A400 ion exchange resin in the extraction of identified acids in vinasse was evaluated using the Langmuir and Freundlich isotherm models. Among the eleven monitored acids, aconitic, malic and glycolic acids were the most frequent in the five vinasse samples analyzed. Aconitic and malic were the ones with the highest concentrations in all samples, ranging from 0.13-12555.41 mgL-1. Regarding the study of adsorption of acids in the Purolite A400 resin, the Langmuir model was the one that best fitted the experimental data obtained, indicating that the adsorption process is favorable and that the resin has a maximum capacity of adsorption of acids in the range of 0.2 - 90.9 mgg-1. It is concluded that vinasse has the potential to be used as an alternative source for obtaining organic acids and that simple methods that meet the principles of green chemistry can be used satisfactorily for the extraction and analysis of these acids in vinasse samples.

Keywords: stillage, carboxylic acids, chromatography, adsorbents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do processo de produção do bioetanol..... 21

Figura 2 – Vinhaça proveniente dos dutos de saída dos destilados da usina sucroalcoleira..... 22

Figura 3 – Fórmula estrutural de alguns dos ácidos orgânicos e aminoácidos reportados na cana-de-açúcar e vinhaça..... 29

Figura 4 – Esquema CLAE..... 38

Figura 5 – Cromatograma CLAE-UV da mistura de 11 padrões dos ácidos orgânicos: aconítico (A), cítrico (C), succínico (S), málico (Ma), maleico (Me), malônico (Mo), tartárico (T), oxálico (O), glutâmico (Glu), lático (L) e glicólico (Gli). Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm..... 51

Figura 6 - Curva de calibração do: (a) ácido glicólico na faixa de concentração 0,05-0,51 $mg.L^{-1}$; (b) ácido tartárico/oxálico na faixa de concentração 0,51-93,5 $mg.L^{-1}$; ácido glutâmico na faixa de concentração 0,9-20,4 $mg.L^{-1}$; ácido málico na faixa de concentração 0,36-23,8 $mg.L^{-1}$..... 54

Figura 7 – Curva de calibração do: (a) ácido malônico na faixa de concentração 0,92-18,7 $mg.L^{-1}$; (b) ácido lático na faixa de concentração 0,06-2,1 $mg.L^{-1}$; ácido cítrico na faixa de concentração 0,7-18,7 $mg.L^{-1}$; ácido succínico na faixa de concentração 1,86-18,7 $mg.L^{-1}$..... 55

Figura 8 – Curva de calibração do: (a) ácido maleico na faixa de concentração 0,015-0,23 $mg.L^{-1}$; (b) ácido aconítico na faixa de concentração 0,01-27,2 $mg.L^{-1}$..... 55

Figura 9 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça A e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm..... 67

Figura 10 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça E e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm..... 67
Figura 11 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça C e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm..... 68
Figura 12 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça D e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm..... 68
Figura 13 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça B e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm..... 69
Figura 14 – Curva cinética não-lineares na adsorção do ácido succínico na vinhaça com resina aniônica PuroliteA400..... 74
Figura 15 - Curvas das isotermas de Langmuir para os ácidos (a) lático; (b) cítrico; (c) aconítico; (d) oxálico/tartárico..... 75
Figura 16 - Modelo de Freundlich para o ácido málico..... 76
Figura 17 - Modelo de Langmuir para o ácido succínico..... 76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Culturas e as respectivas biomassas utilizadas na produção do bioetanol.... 18
Quadro 2 – Alternativas de aplicação da vinhaça em diferentes setores..... 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção mundial de bioetanol no período de 2017 a 2020..... 19
Tabela 2 – Produção brasileira de bioetanol nas safras de 2010/2011 a 2020/2021..... 19
Tabela 3 – Composição inorgânica da vinhaça relatada na literatura..... 23
Tabela 4 – Composição orgânica da vinhaça relatada na literatura..... 24
Tabela 5 – Ácidos orgânicos presentes no caldo da vinhaça..... 30
Tabela 6 – Composição de alguns ácidos orgânicos relatados para a vinhaça..... 31
Tabela 7 – Composição de alguns aminoácidos relatados para a vinhaça..... 32
Tabela 8 – Concentração dos ácidos orgânicos de solução estoque utilizada nas análises por CLAE..... 45
Tabela 9 – Fragmentos monitorado para cada ácido orgânico durante analises por LC-MS no modo SIM negativo..... 46
Tabela 10 – Concentração dos ácidos orgânicos para a construção da curva de calibração..... 49
Tabela 11 – Valores de LD e LQ para cada ácido analisado por CLAE..... 53
Tabela 12 – Faixa de linearidade para cada ácido analisado por CLAE..... 53
Tabela 13 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido glutâmico..... 56
Tabela 14 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido málico..... 57
Tabela 15 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido cítrico..... 58
Tabela 16 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido aconítico..... 59
Tabela 17 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido glicólico..... 60
Tabela 18 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido malônico..... 61
Tabela 19 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido succínico..... 62
Tabela 20 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão dos ácidos oxálico e tartárico..... 63
Tabela 21 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido lático..... 64
Tabela 22 – Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido maleico..... 65
Tabela 23 – Concentração dos ácidos orgânicos nas amostras de vinhaças..... 69
Tabela 24 – Tempo Ideal de cada ácido orgânico..... 73
Tabela 25 – Parâmetros de Isotermas de Adsorções dos ácidos orgânicos na vinhaça.... 76

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação de Langmuir..... 42
Equação 2 – Equação do fator de separação..... 42
Equação 3 – Equação de Freundlich..... 43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 16
1.1. Biocombustíveis..... 17
1.2. Bioetanol..... 18
1.3. Vinhaça..... 21
1.4. Ácidos Orgânicos..... 28
1.5. Química Verde (QV)..... 35
1.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..... 38
1.7. Adsorção..... 40
1.8 Modelos de Isotermas..... 41
2. OBJETIVO..... 43
2.1 Objetivo Geral..... 43
2.2 Objetivos Específicos..... 43
3. PARTE EXPERIMENTAL..... 44
3.1. Amostras de Vinhaça..... 44
3.2. Padrões Analíticos..... 44
3.3. Reagentes..... 44
3.4. Preparo das soluções dos padrões analíticos..... 45
3.5. Desenvolvimento do método de análise dos ácidos orgânicos por CLAE..... 45
3.6. Extração dos ácidos da vinhaça..... 46
3.7. Validação do método de análise dos ácidos orgânicos na vinhaça por CLAE 47
3.8 Quantificação dos ácidos orgânicos na vinhaça..... 49
3.9 Experimento de Isotermia..... 50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 50
4.1. Desenvolvimento do método e análise dos ácidos orgânicos por CLAE-UV e LC-MS..... 50
4.2. Validação do método CLAE-UV/DAD..... 52
4.3. Análise Qualitativa dos Ácidos Orgânicos na Vinhaça..... 65
4.4 Análise Quantitativas dos Ácidos Orgânicos na Vinhaça..... 69
4.5 Cinética..... 73
4.6 Isoterma..... 74

5. CONCLUSÕES..... 77
REFERÊNCIAS..... 79

INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados são importantes produtos econômicos e políticos para a sociedade mundial por serem uma das principais fontes de energia e de matéria prima. Compondo 36,4% da matriz energética utilizada mundialmente, o petróleo é uma fonte não renovável e poluidora, principalmente durante o seu refino, pois consome grandes quantidades de energia e água, além de produzir resíduos que impactam negativamente no solo, água e ar (MENDES et al, 2017; MARIANO, 2001).

Por ser um recurso não renovável, fontes alternativas de energia tão eficientes e menos poluentes do que o petróleo vem sendo desenvolvidas nas últimas décadas. Uma destas fontes alternativas, amplamente empregada atualmente, em especial para os veículos automotores, são os biocombustíveis (PEREIRA, 2008).

No Brasil, o consumo de biocombustíveis vem aumentando nas últimas décadas devido à alta produção e disponibilidade do bioetanol, gerado a partir da cana-de-açúcar (CONAB, 2021).

Apesar de ser considerado um combustível menos poluente, durante o processo de produção do bioetanol diversos resíduos considerados como poluentes são produzidos em larga escala.

Entre estes resíduos encontra-se a vinhaça, um efluente líquido gerado num montante que varia de 9 a 17 litros por litro de bioetanol produzido (CONAB, 2015; NETO, 2016).

Apesar de ser atualmente empregada como fertilizante na lavoura da cana-de-açúcar, sua aplicação no solo é restrita devido ao seu alto teor de matéria orgânica e seu elevada acidez, fatores relacionados com a presença de ácidos orgânicos em sua composição (PIRES; FERREIRA, 2008; ZAIAT, 2021).

Diversos estudos focando na degradação da matéria orgânica presente na vinhaça, para o seu melhor aproveitamento na fertirrigação, vêm sendo desenvolvidos. No entanto muitos dos compostos orgânicos presentes nesse efluente, incluindo os ácidos, são utilizados como insumos em diversos setores industriais, como os ácidos aconítico, lático e cítrico (DRUMOND; BARBOSA; FRANÇA, 2013).

A extração dos ácidos orgânicos da vinhaça, foco deste trabalho, e o direcionamento deles para outros processos produtivos pode ser uma rota promissora para o melhor aproveitamento do conteúdo inorgânico da vinhaça na lavoura, bem como, para a minimização

da fabricação destes ácidos por processos de difícil controle e/ou que envolvem reagentes derivados de petróleo.

1.1. BIOCOMBUSTÍVEIS

Os biocombustíveis são combustíveis provenientes de uma biomassa renovável que podem substituir totalmente ou parcialmente o uso de combustíveis fósseis como a gasolina. O uso deste tipo de combustível apresenta aspectos positivos e negativos para o meio ambiente e a sociedade (PAULA, 2013).

Uma das vantagens desta fonte de energia renovável, comparados aos combustíveis fósseis, é a sua menor emissão dos Gases do Efeito Estufa (GEE). Nas emissões diretas, o gás carbônico liberado durante a queima dos biocombustíveis é consumido pelo processo de fotossíntese das culturas que o originou, neutralizando as emissões deste gás. A emissão deste e de outros GEE gerados durante o ciclo de produção dos biocombustíveis (transporte, armazenamento, conversão e distribuição), denominada de emissões indiretas, também são menores que os gases gerados na obtenção e queima dos combustíveis fósseis (RUTZ; JANSSEN, 2007).

Uma desvantagem dos biocombustíveis, no entanto, é que o processo de cultivo das plantações pode causar diversos impactos ao meio ambiente e à sociedade, como esgotamento no solo e poluição do ar, solo e águas (RUTZ; JANSSEN, 2007).

Apesar dos custos de produção dos biocombustíveis em geral serem inferiores aos não renováveis, eles não possuem um valor econômico igual o custo dos não renováveis, pois o balanço energético e a eficiência são inferiores comparados aos combustíveis fósseis. Esta é uma das principais razões pela qual ainda existe o uso contínuo e a dependência mundial do petróleo. No Brasil, o consumo de petróleo e seus derivados vêm diminuindo nas últimas décadas devido à sua substituição por fontes energéticas renováveis tais o biogás, biodiesel e o bioetanol (RUTZ; JANSSEN, 2007).

1.2. BIOETANOL

O bioetanol (C_2H_50H) é um combustível incolor e inflamável fabricado e comercializado de forma hidratado (Álcool Etílico Hidratado Combustível - AEHC) ou anidro (Álcool Etílico Anidro Combustível – AEAC). A diferença entre eles é o teor de água em sua composição, sendo 5 % no hidratado e 0,5 % no anidro (GORREN, 2009).

Este biocombustível é gerado a partir da fermentação de uma biomassa rica em amido, açúcar ou celulose. Diversas biomassas podem ser utilizadas para a produção do bioetanol (Quadro 1), sendo as mais comuns o milho, predominante nos Estados Unidos da América (EUA); a beterraba na Alemanha; o sorgo sacarino na África; o trigo na Europa e a cana-de-açúcar em diversos países como Brasil e Índia (BERMANN, 2008; PAULA, 2013).

Quadro 1 - Culturas e a respectiva biomassa utilizada na produção do bioetanol

Cultura	**Biomassa**
Milho Trigo Sorgo Centeio Cevada Batata	Amido
Cana-de-açúcar Sogro Doce Beterraba	Açúcar
Bagaço Palha Folhas e Caules (Milho) Resíduos Florestais Relva Choupo Salgueiros Resíduo Sólido	Celulose

Fonte: RUTZ; JANSSEN, 2007

No Brasil, este biocombustível começou a ser produzido em larga escala em 1975, logo após a primeira crise do petróleo, através de um programa do governo nacional, o Programa Pró-Álcool. O objetivo do governo era diminuir a dependência do país em relação a importações do petróleo e estimular o setor sucroalcooleiro que estava sofrendo com a queda do preço do açúcar (KOHLHEPP, 2010).

No ano de 1979, o programa foi ampliado, através do incentivo à geração de bioetanol anidro para ser utilizado como aditivo na gasolina e como combustível alternativo para os

motores dos novos automóveis da década de 80. Desde então, o investimento neste biocombustível continuou em ascensão (KOHLHEPP, 2010).

Nos últimos anos o Brasil tem liderado, junto com os EUA, a produção mundial de bioetanol gerando, juntos, cerca de 84 % da produção mundial (Tabela 1). Na safra brasileira de 2019/2020 foram gerados cerca de 35.5 bilhões de litros de bioetanol (Tabela 2) (CONAB, 2021).

Tabela 1 - Produção mundial de bioetanol no período de 2017 a 2020

Região	**Produção de Bioetanol (mil.Gal.)**				**Produção**
	2017	**2018**	**2019**	**2020**	**Mundial (%)**
EUA	15,9	16	15,7	13,9	54
Brasil	6,8	7,9	8,5	8,0	30
União Europeia	1,4	1,4	1,4	1,2	5
China	860	1,0	900	930	3
Canadá	470	480	500	430	2
Índia	210	400	530	510	2
Tailândia	370	390	420	390	1
Argentina	290	290	290	210	1
Outros	414	549	600	659	2
Total	26,8	28,5	29	26,4	100

Fonte: RFA, 2022

Tabela 2 – Produção brasileira de bioetanol nas safras de 2010/2011 a 2020/201

Safra	**Produção Etanol (mil m^3)**
2010/2011	27.326
2011/2012	22.681
2012/2013	23.226
2013/2014	27.475
2014/2015	28.480
2015/2016	30.232
2016/2017	27.254
2017/2018	27.865
2018/2019	33.114
2019/2020	35.595
2020/2021	32.500

Fonte: CONAB, 2021

O princípio da produção do bioetanol é baseado na fermentação de moléculas de açúcares (Figura 1). Quando se utiliza biomassa rica em açúcares esta matéria-prima passa pelo processo de lavagem e moagem, onde 70 % da biomassa se transformam em caldo bruto e 30 % permanece na forma sólida, denominada de bagaço. Já para as biomassas ricas em amidos e celulose é necessária uma etapa prévia de transformação destes amidos em açúcares, através do processo de hidrólise (GORREN, 2009).

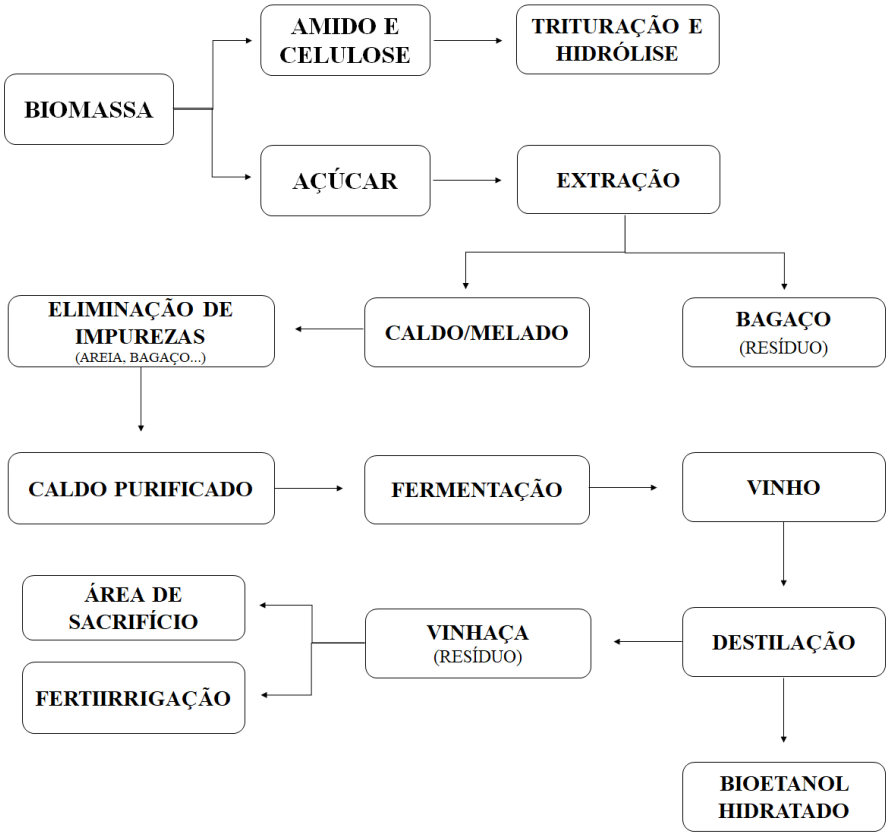
Após a extração dos açúcares, o caldo passa por peneiras para eliminação de resíduos sólidos remanescentes (areia e resíduos de bagaço) e posteriormente reagentes são adicionados para que ocorra a decantação de demais impurezas. Após a separação do material decantado, o melado puro recebe o nome de caldo purificado e segue para o processo de esterilização para eliminação de micro-organismos. O material decantado (lodo) segue para o sistema de filtração, utilizando bagaço como meio filtrante, para recuperação do açúcar nele contido. A mistura do bagaço moído com o lodo da decantação é denominada de torta de filtro (GORREN, 2009).

A próxima etapa é o da fermentação que é realizada misturando o caldo purificado com as leveduras (*Saccharomyces cerevisia*), responsáveis pela hidrólise de glicose produzindo bioetanol e gás carbônico. O processo de fermentação dura algumas horas e como resultado se obtém o vinho (mistura de leveduras, açúcar não fermentado e cerca de 10 % de bioetanol) (GORREN, 2009).

O vinho é então transportado para colunas de destilação onde é aquecido até a evaporação. Durante o processo de evaporação, seguido da condensação, o vinho é separado do bioetanol dando origem ao bioetanol hidratado, usado como bioetanol combustível (grau alcoólico em torno de 96 %). A mistura restante, denominada de vinhaça, é transportada por dutos até tanques de contenção onde permanecerão armazenadas até seu descarte e/ou utilização (GORREN, 2009).

Para obtenção do bioetanol anidro, com graduação alcoólica de cerca de 99,5 %, uma etapa de desidratação é realizada no bioetanol hidratado. Diversas técnicas são utilizadas entre elas a mistura do bioetanol hidratado com um solvente miscível em água, seguido da evaporação da água com o solvente, e o peneiramento molecular (também denominado de pervaporação), onde são utilizadas peneiras que retêm as moléculas da água (GORREN, 2009).

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção do bioetanol



A maior parte dos subprodutos gerados durante a fabricação do bioetanol não possuem uma direção de aproveitamento que consuma totalmente o montante produzido. Em sua maioria, eles não são aproveitados comercialmente e/ou apresentam baixo valor agregado, mas muitos deles, como a vinhaça, possuem composição e propriedades que os tornam potencialmente aproveitáveis em determinados processos produtivos e/ou para a redução dos custos destes processos (SCHNEIDER et al., 2012).

1.3. VINHAÇA

A vinhaça (Figura 2), também conhecida como vinhoto ou restilo, é um efluente caracterizado por uma fase líquida contendo sólidos em suspensão, e é resultante da etapa de destilação do vinho durante o processo de fabricação do bioetanol (CONAB, 2015; NETO, 2016).

Figura 2 – Vinhaça proveniente dos dutos de saída do destilador da usina sucroalcooleira

Fonte: Arquivo do grupo de pesquisa

Este efluente possui odor característico e coloração escura, devido à degradação térmica de substâncias redutoras (tais como, fenóis, melanoidinas, ácidos húmico e tânico), presentes na concentração de 7900-9500 mgL^{-1}. Ele sai do processo de destilação com temperaturas que variam de 80 a 100ºC e passa por torres de resfriamento, chegando a uma temperatura de 40-50 ºC, ou então é encaminhado para os tanques de contenção onde se resfria naturalmente (BERNARDES et al, 2019).

O vinho destilado é obtido a partir da fermentação do mosto (fontes de açúcares + leveduras) e dependendo da natureza da cana e do tipo de mosto utilizado no processo fermentativo, variações na quantidade da vinhaça são encontradas. Quanto mais concentrado for o mosto, menor a quantidade de vinhaça produzida. Para mosto preparados a partir do caldo de cana, pouco concentrado (que gera vinho com teor alcoólico de 5 a 6 ºGL) a produção de vinhaça é de 14 a 17 litros por litro de bioetanol, enquanto que a fermentação do caldo concentrado (aquela na qual se obtém um teor alcoólico do vinho de 9,0 a 11 ºGL) gera em torno de 9 a 13 litros de vinhaça por litro de combustível. Para os processos fermentativos que utilizam mosto preparado a partir do melaço (produto obtido da fabricação do açúcar, contendo teor de açúcares que varia de 35 a 50%), diluído com água ou com o caldo da cana (denominado de mosto misto) esta geração é de cerca de 10 a 14 litros (NETO, 2016; ALMEIDA, 2019; DIAS et al., 2015).

A composição da vinhaça é formada em grande parte por matéria orgânica e, em menor quantidade, por minerais, sendo que os teores destes componentes são muito mais concentrados na vinhaça produzida a partir do melaço (ROSSETTO, 1987).

A composição inorgânica da vinhaça é amplamente relatada na literatura, todas elas mostrando que este efluente contém um alto teor de potássio e teores significativos de nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio e sulfatos (GOES; NETO, 2011; FERREIRA et al., 2011;

VADIVEL et al., 2014). Outros micronutrientes como, zinco, ferro, manganês e cobre, também são relatados, porém em menor quantidade e em estudos isolados (VADIVEL et al., 2014; SCULL et al., 2012) A Tabela 3 sumariza os teores destes nutrientes já reportados na literatura para a vinhaça.

Tabela 3 - Composição inorgânica da vinhaça relatada na literatura

Nutriente	**Concentração (mgL^{-1})**					
	Prada[1]	**Vadivel[2]**	**Neto[3]**	**Freire[4]**	**Filho[5]**	**Sopral[6]**
Fósforo (P)	10-120	-	18-188	200	90-500	10-210
Nitrogênio (N)	150-700	0,13*	90-885	280	260-350	150-700
Potássio (K)	1200-2100	0,79*	814-3852	1470	1110-2000	120-2100
Magnésio (Mg)	200-490	-	97-456	290	210-410	200-490
Calcio (Ca)	130-1540	-	71-1096	460	130-760	130-1540
Sulfato (SO_4)	600-760	-	790-2800	1320	-	600-760
Cobre (Cu)	-	0,27	-	7	-1-18	-
Zinco (Zn)	-	0,7	-	2	2-3	-
Ferro (Fe)	-	12,7	2-200	69	45-110	-
Manganês (Mn)	-	0,42	-	-	5-10	-
Sódio (Na)	-	-	8-200	-	-	-

[1]PRADA; GUEKEZIAN; SUÁRES-IHA, 1998; [2]VADIVEL et al, 2014; [3]NETO; NAKAHODO, 1995; [4] FREIRE; CORTEZ, 2000; [5]FILHO; LEME, 1984; [6]SOPRAL, 1986

* valor expresso em %

Diferentemente da composição inorgânica da vinhaça, uma revisão sistematizada acerca do conteúdo orgânicos da vinhaça mostrou que estes dados são escassos na literatura. De uma forma geral os estudos apresentam os teores de sólidos: totais (23.700-81.500 mgL^{-1}), fixos (3.700-21.500 mgL^{-1}) e voláteis (20.000-60.000 mgL^{-1}); carbono orgânico (8.700-22.900 mgL^{-1}) e matéria orgânica (3.800-63.400 mgL^{-1}) (MORATTI, 2010).

Estudos especificam também que na composição desta matéria orgânica os ácidos orgânicos são os principais componentes (13 % do total de compostos carbonáceos) (PARNAUDEAU et al., 2008). Carboidratos, açúcares (trealose, galactose, frutose, glicose, sacarose) e polióis (inositol, arabitol, sorbitol, manitol) também são descritos (Tabela 4) (PARNAUDEAU et al., 2008; FENANDES et al., 2017).

Tabela 4 - Composição orgânica da vinhaça relatada na literatura

Compostos carbonáceos		**Concentração[1] (% de carbono orgânico)**	**Concentração[2] (gL^{-1})**
Carboidratos		1,0	3,42 (vinhaça bruta) 2,65 (vinhaça filtrada)
Açúcares	Trealose	0,1	-
	Galactose	0,1	-
	Frutose	0,1	-
	Glicose	0,4	-
	Sacarose	0,3	0,22
Alcoóis e Polióis	Inositol	0,2	0,35
	Arabitol	0,3	0,06
	Sorbitol	0,1	
	Manitol	0,2	0,09
	Propilegoglicol	-	0,08
	2,3-butanodiois	-	0,57
	Glicerol	-	5,86
	Eritriol	-	0,09
	Bioetanol	-	3,83

[1]PARNAUDEAU et al., 2008; [2]DOWD et al., 1994;

A gestão deste efluente tem sido um grande desafio para o setor sucroalcooleiro, pois além do grande volume produzido, há ausência de uma direção de aproveitamento que consuma totalmente o montante gerado (NETO, 2016).

Até 1960 a gestão desse resíduo era feita descartando-a no meio ambiente. No entanto os altos teores de potássio e de Demanda Química e Bioquímica de Oxigênio (DQO na faixa de 15.000 a 65.000 mgL^{-1} e DBO na faixa de 6.000 a 25.000 mgL^{-1}) incorreram em sérios impactos ambientais, tais como, poluição do solo e de águas subterrâneas e superficiais; salinização e acidificação do solo, poluição toxicidade e limitação de absorção de nutrientes e água pelas plantas, desestabilização da estrutura do solo, exalação de odor fétido e atração de insetos e proliferação de doenças (SILVA; BONO; PEREIRA, 2014; CONAB, 2015; LAIME et al, 2011).

Nos anos seguintes, esta prática foi proibida e legislações foram sancionadas, visando à regulamentação da contenção e o controle da disposição deste efluente para o meio ambiente

(BRASIL, 1967; BRASIL, 1978; BRASIL 1980; BRASIL, 2013; CETESB, 2005; COPAM, 2011; COPAM, 2013; PARANÁ, 2014).

Estas legislações preconizam que a vinhaça seja contida em tanques, denominados de áreas de sacrifício, que são regiões delimitadas próximas às destilarias onde são abertas valas no solo para a deposição do resíduo sucroalcooleiro. Estas valas devem ser adequadamente projetadas, com uma impermeabilização apropriada e constantes manutenções para evitar o escoamento da vinhaça pelo solo (LAIME et al, 2011; ZAIAT, 2019).

No entanto a falta de manutenção apropriada bem como a exposição deste produto a céu aberto ainda resulta em problemas socioambientais, tais como, contaminação do lençol freático por nutrientes, sulfatos e matéria orgânica; salinização e acidificação do solo; lixiviação de metais; exalação de odor fétido e emissão de gases poluentes, como os gases de efeito estufa. A exposição da vinhaça à céu aberto emite óxido nitroso, gás cerca de 300 vezes mais poluente do que o dióxido de carbono (LAIME et al, 2011; ZAIAT, 2019).

Atualmente, o aproveitamento da vinhaça em diversos processos e como insumo na fabricação de diferentes produtos tem sido relatado. Estas rotas de aproveitamento apesar de contribuírem para a gestão deste resíduo ainda possuem algumas limitações (Quadro 2) (DRUMOND; BARBOSA; FRANÇA, 2013).

Quadro 2 - Alternativas de aplicação da vinhaça em diferentes setores

APLICAÇÃO	PROCESSO PRODUTO	LIMITAÇÕES	REFERÊNCIAS
Reaproveitamento no processo de produção bioetanol	Substituinte da água durante a correção do brix do caldo	volume a ser utilizado é limitado não consumindo todo montante produzido	QUEIROZ et al., 2017; ALMEIDA, 2019; LAIME et al., 2011; POVEDA., 2014; PEREIRA, 2009; GOMES; EÇA; VIOTTO, 2011
	Concentração para posterior queima nos fornos da caldeira aproveitando poder calorífico do concentrado	Exige concentração da vinhaça a cerca de 50° Brix, consumindo grande quantidade vapor comprometendo o balanço térmico da usina; altos investimentos na implantação de concentradores devem ser totalmente em aço inox pois a vinhaça é corrosiva	
Construção Civil	Mistura solo–vinhaça concentrada para utilização na fabricação de tijolos prensados	Volume a ser utilizado é limitado; tijolo solo-vinhaça tem baixo valor agregado; viabilidade econômica somente se fabricado muito próximo ao local de produção da vinhaça devido aos custos de logística.	CORRÊA et al., 2005; FILHO; ARAÚJO, 2016; LAIME et al., 2011; GOMES; EÇA; VIOTTO, 2011; CORAZZA; FILHO, 2000; ROLIM, 1996;
Produção e comercialização de energia elétrica	Biodigestão anaeróbia da vinhaça	Custo elevado para construção dos biodigestores e demais tecnologias necessárias; dificuldade de distribuição da energia excedente devido às deficiências nas linhas de transmissão e burocracias; consumo dentro da usina inviável uma vez que são autossuficientes em geração de energia elétrica pelo aproveitamento da biomassa	FILHO; ARAÚJO, 2016; LAIME et al., 2011; MACHADO et al., 2010; SZYMANSKI. BALBINOT; SCHIMER, 2010 ELAIUY, 2016 BALDACIN; PINTO, 2015
Produção de Biodiesel	Cultivo de microalgas	Tecnologia de produção ainda incipiente, necessita-se mais pesquisa para que se obtenha um sistema de processamento viável	OLIVEIRA, 2011. FERNANDES et al., 2017; GUARIEIRO, 2019; FOGAÇA et al., 2016; CANDIDO, 2019; SANTANA, 2016

Quadro 2 - Alternativas de aplicação da vinhaça em diferentes setores continuação

Produção e comercialização de Biogás (metano e gás carbônico)	Biodigestão e purificação do biogás	Alto investimento na implantação dos biodigestores e purificadores; comercialização requer a construção de novos gasodutos e/ou sua integração à rede já existente	SALOMON, 2007; POVEDA., 2014; CRUZ et al., 2013 GRANATO; SILVA, 2002; COELHO, 2012; FILHO; ARAÚJO, 2016; ALMEIDA, 2019; LAIME et al., 2011 MACHADO et al., 2010 PEREIRA, 2009; BALDACIN; PINTO, 2015
Produção de levedura para uso na suplementação alimentar animal	Adição no processo de levedura	Elevado custo produtivo	COELHO, 2012; FILHO; ARAÚJO, 2016; GOMES; EÇA; VIOTTO, 2011; LAIME et al., 2011 ELAIUY, 2016; CORAZZA; FILHO, 2000;
Ração Animal	Incorporação na produção de ração bovina, suína e aviária	Volume a ser utilizado é limitado; faltam pesquisas suficientes para que se atinja os níveis nutricionais desejados	FILHO; ARAÚJO, 2016; LAIME et al., 2011; SCULL et al., 2012 ROLIM, 1996; CORAZZA; FILHO, 2000; MACHADO et al., 2010; PEREIRA, 2009;
Agricultura	Concentração da vinhaça até a obtenção de um composto organo-mineral (biofertilizante)	Demanda alto consumo de energia elétrica e vapor no processo de bombeamento, resfriamento e concentração; altos investimentos na implantação de concentradores de aço inox e na fábrica de biofertilizantes	COELHO, 2012; ALMEIDA, 2019; GOMES; EÇA; VIOTTO, 2011; PIRES; FERREIRA, 2008; POVEDA., 2014; LAIME et al., 2011; CRUZ et al., 2013; ROLIM, 1996; MACHADO et al., 2010; PEREIRA, 2009; SANTOS et al., 2009; SOUZA, 2018
	Fertirrigação	volume a ser utilizado é limitado; altos custos de transporte até os locais de aplicação; problemas socioambientais quando aplicada no solo em quantidades irregulares.	

Dentre as diversas aplicações apresentadas, a direção de aproveitamento atualmente mais empregada na gestão da vinhaça é a fertirrigação em lavouras de cana-de-açúcar, em virtude do investimento relativamente baixo e da simplicidade da tecnologia necessários (PIRES; FERREIRA, 2008).

O teor de nutrientes presentes na vinhaça faz com que a sua aplicação no solo, de forma controlada, traga benefícios para as áreas de cultivo como nutrição e melhoramento ou correção de parâmetros do solo (microbiota, pH, retenção hídrica, entre outros) (DRUMOND; BARBOSA; FRANÇA, 2013; PIRES; FERREIRA, 2008). Por outro lado, a aplicação de altas dosagens de vinhaça nas culturas pode trazer impactos socioambientais e, portanto, precisa ser controlada (ZAIAT, 2019).

A dosagem máxima de vinhaça que pode ser aplicada no solo em cultura de cana-de-açúcar é determinada por legislações estaduais. No estado de São Paulo estes parâmetros são definidos pela Norma Técnica P4.231 da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). De acordo com esta norma a dosagem da vinhaça a ser aplicada nas áreas de cultivo, em geral, não consome o montante de vinhaça produzido nas usinas. Adicionalmente, o transporte da vinhaça até os locais de aplicação demanda altos custos, limitando a distância de aplicação da mesma. O transporte da vinhaça até as áreas mais distantes das usinas tem sido realizado através da sua concentração o que também requer investimentos (SILVA et al, 2018).

Desta forma o aprimoramento das demais técnicas apresentadas no Quadro 2, bem como o desenvolvimento de novos processos de aproveitamento da vinhaça vem sendo constantemente investigado.

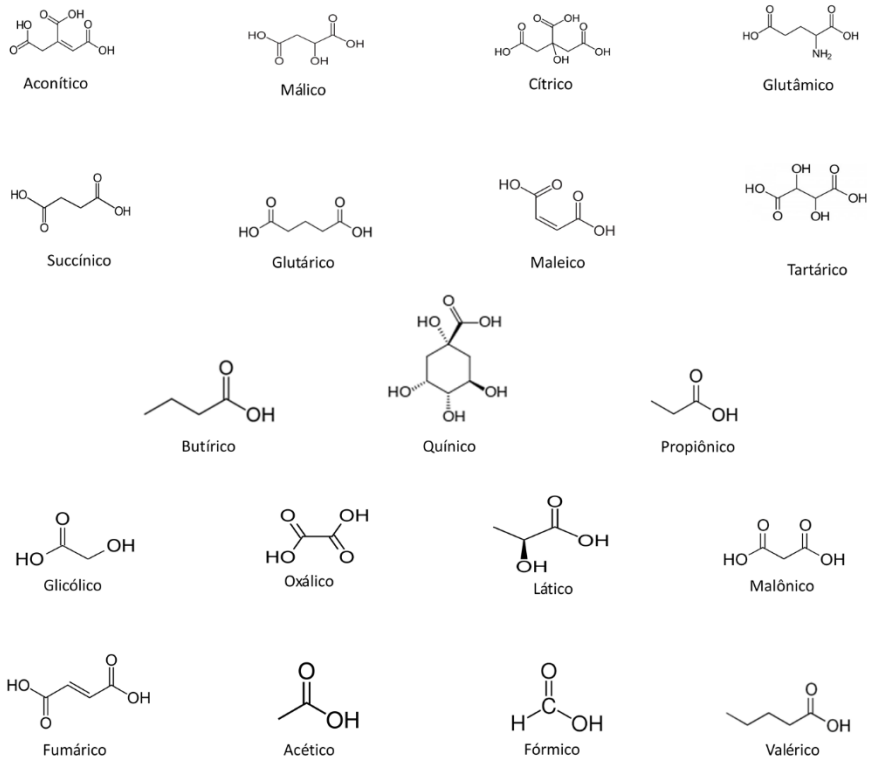
Neste estudo é proposto o desenvolvimento de processo para purificação e/ou isolamento dos ácidos orgânicos presentes na vinhaça, de forma que os mesmos possam ser empregados em outros setores industriais; e a vinhaça resultante, com menor teor de matéria orgânica e acidez, possa ser empregada em maior quantidade no solo minimizando alguns dos atuais impactos ambientais previamente citados.

1.4. ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos são metabólitos secundários sintetizados por diversas espécies vegetais para desempenhar diversas funções, entre elas a de proteção ao ataque de pragas, equilibrar a carga de cátions e manter o potencial osmótico (SNYDER, 1995; JONES, 1998).

Estudos mostram que os ácidos orgânicos presentes na vinhaça compreendem os ácidos naturalmente presentes na cana-de-açúcar (concentração em torno de 0,1 a 0,15 g de ácidos orgânicos a cada 100 g de colmos) ou ácidos que são formados durante o processo de produção do bioetanol. Alguns aminoácidos provenientes da hidrólise das proteínas, como o ácido glutâmico, também estão presentes (Figura 3) (TOLEDO; GANCHO, 1996; NELSON, 1929).

Figura 3 - Fórmula estrutural de alguns dos ácidos e aminoácidos reportados na cana-de-açúcar e vinhaça



Fonte: PubChen, 2022

Dos ácidos presentes naturalmente na cana-de-açúcar, o ácido aconítico é o majoritário e sua concentração pode variar dependendo da variedade da cana, do tempo de maturação e das condições de plantio (solo e clima). Está presente em maior concentração nas pontas, folhas e nas plantações imaturas e, em menor quantidade, nos derivados da cana. A concentração média relatada é de aproximadamente 60 % nas folhas, 1 % para o caldo de cana e de 3 a 7 % no melaço. Outros ácidos como oxálico, cítrico, tartárico, málico, glutâmico, glicólico, maleico, succínico, malônico e fumárico também estão reportados para cana-de-açúcar (Tabela 5) (NELSON, 1929; GUTIERREZ; FERRARI, ORELLI, 1989).

Tabela 5 - Ácidos orgânicos presentes no caldo da vinhaça

Ácido Orgânico	**Concentração[1] (mgL^{-1}/matéria seca)**	**Origem**
Aconítico	5000-8000	
Málico	1200-1800	
Cítrico	900-1800	Natural da cana-de-açúcar
Oxálico	40-200	
Succínico	100-200	
Tartárico	10-180	
Glicólico	Traços-150	
Acético	200-300	Gerado durante o processo de clarificação
Lático	250-300	

[1]WALFORD, 1996;

Durante o processo de produção do bioetanol alguns outros ácidos são formados como resultado da atividade microbiana e/ou de reações químicas. Os que estão geralmente presentes na vinhaça são o ácido fórmico, acético, valérico, propiônico, butírico, quínico e lático (Figura 3). Os ácidos fórmico, propiônico, butírico, valérico e quínico são resultantes da oxidação da sacarose. Os ácidos acético e lático são formados pela ação de álcalis na sacarose, durante o tratamento do caldo com o leite de cal. Na presença desta solução alcalina concentrada e sob aquecimento a sacarose tende a se decompor nos referidos ácidos (NELSON, 1929; ZAPATA, 2007; CASTRO; ANDRADE, 2007).

Durante o processo de evaporação, que ocorre geralmente a temperatura de 85 ºC, tende a ocorrer também a degradação do ácido aconítico dando origem ao ácido oxálico, que se precipita facilmente ficando presente na vinhaça durante o processo de destilação (WALTHEW 1996; WALFORD 2002).

As Tabelas 6 e 7 apresentam alguns dos ácidos e aminoácidos e os respectivos teores já reportados na literatura para a vinhaça.

Tabela 6 - Composição de alguns dos ácidos orgânicos relatados para a vinhaça

Ácidos Orgânicos	**Concentração[1] (% de C)**	**Concentração[2] (mg/kg)**	**Concentração[3] (mgL^{-1})**	**Concentração[4] (mgL^{-1})**	**Concentração[5] (mgL^{-1})**
Lático	0,4-1,0	606	7700	12697	ND
Acético	2,6-8,4	1608	1600	1617	ND
Propiônico	0,8-3,3	402	ND	911	ND
Fórmico	0,3-0,5	275	600	3556	ND
Butírico	0,1-0,9	ND	ND	1617	ND
Pirúvico	0,0-0,8	ND	ND	ND	ND
Valérico	0,0-0,9	ND	ND	ND	ND
Málico	0,2-1,2	852	ND	6168	ND
Tartárico	0,0-0,2	133	ND	ND	ND
Oxálico	4,0-5,5	100	ND	ND	15,8-72,3
Cítrico	0,2	878	ND	ND	ND
Aconítico (*cis* e *trans*)	1,9-6,9	3116	ND	ND	ND
Succínico	ND	ND	ND	3624	267,6-1007,5
Malônico	ND	ND	ND	ND	4,0-68,1
Fumárico	ND	ND	ND	ND	7,4-63,2
Quínico	ND	ND	500	ND	ND

[1]PARNAUDEAU et al., 2008: a faixa especificada se refere aos teores encontrado em amostras de vinhaça diluída e vinhaça concentrada termicamente. Valores expressos em função da porcentagem de carbono orgânico total; [2]DOELSCH et al., 2009: valores expressos em mg de ácido por vinhaça seca (7,4 % de umidade); [3]DOWD et al., 1994; [4]SANTOS et al., 2014; [5] BENKE; MERMUT (1998); ND: não determinado

Tabela 7 - Composição de alguns dos aminoácidos relatados para a vinhaça

Aminoácidos	**Concentração[1] (%)**	**Concentração[2] (gL^{-1})**
Ácido aspártico	7,79-8,85	0,93
Treonina	5,66-7,31	0,12
Serina	4,64-4,81	0,13
Ácido Glutâmico	12,11-13,23	0,32
Prolina	4,98-6,02	0,42
Glicina	3,61-4,08	0,11
Alanina	2,50-3,74	0,22
Cisteina	1,81	ND
Valina	5,66-7,13	0,10
Metionina	0,00-4,53	0,09
Isoleucina	5,76-6,79	0,12
Leucina	3,10-4,53	0,14
Tirosina	4,99-6,23	0,09
Fenilalanina	4,73-5,09	0,10
Histidina	4,72-5,09	0,03
Lisina	9,28-9,96	0,11
Arginina	7,47-10,57	0,05

[1]SCULL et al., 2012; [2]ROBERTIELLO, 1982; ND: não detectado

Os ácidos relatados para a cana-de-açúcar e seus derivados possuem vasta aplicação em vários segmentos químicos e sua atual produção industrial é feita através de processos fermentativos ou sínteses químicas (CHEN; NIELSEN, 2016).

O ácido aconítico ($C_6H_6O_6$) é usado na indústria de processamento de alimentos como acidulante e pode ser usado na síntese de plastificantes. Em geral a sua produção industrial é efetuada pela síntese de um aconitato alcalino-terroso na presença de água com um ácido mineral, seguido de cristalização. No Brasil ele é utilizado na indústria alimentícia, na produção de chás (KANITKAR; AITA; MADSEN, 2013).

O ácido málico ($C_4H_6O_5$) é produzido através da síntese do anidrido maleico. É muito empregado como acidulante, aromatizante e estabilizante na indústria alimentícia. Também serve para preservar a doçura e ajustar o pH de alimentos. Na indústria farmacêutica, o ácido málico é utilizado na higienização e regeneração de ferimentos e queimaduras. Na indústria cosmética e usado para ajustar o pH das formulações de diversos produtos. No Brasil é empregado na produção de balas e nos esmaltes (SEQUEIRA, 2012; JENSEN, 2007; PUBCHEM, 2021).

O ácido lático ($C_3H_6O_3$) é produzido através da fermentação lática, uma fermentação controlada de hexoses de leite, milho e melaço através da bactéria *Streptococcus lactis*. Neste processo uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de ácido pirúvico e, posteriormente, a redução destas duas moléculas de ácido pirúvico gera duas moléculas de ácido lático. Ele pode ser obtido também através da síntese química do etanal com uma solução de ácido sulfúrico e cianeto de sódio. É um produto químico que tem sido utilizado como acidulante e conservante de bebidas e alimentos como, por exemplo, na margarina. Também é empregado em curtumes e como mordente na indústria têxtil. Empregado na fabricação de polímeros biodegradáveis e termoplásticos. Na forma de lactato é muito utilizado na indústria farmacêutica e de cosmético como nos sabonetes líquidos (SERAFIM, 2010; GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009; PUBCHEM, 2021).

O ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) é sintetizado a partir da fermentação aeróbica da sacarose e dextrose pelo microorganismo *Aspergillus niger*. Devido as suas propriedades antioxidantes, acidulantes, flavorizantes, sequestrantes e reguladoras de acidez, este ácido é amplamente utilizada pelas indústrias alimentícias, de bebidas e cosmética. No Brasil é encontrado, por exemplo, nos sucos de frutas e cremes faciais (SEQUEIRA, 2012; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2015; PUBCHEM, 2021).

O ácido glutâmico ($C_5H_9NO_4$) é fabricado pela fermentação a partir de fontes de carboidratos. Seu sal de arginina é usado em formulações farmacêuticas indicadas no tratamento de astenia, fadiga e hiperamoninemia. O sal de potássio, sódio e amônio é usado em largas quantidades na indústria alimentícia como um condimento ou realçador de sabor como nos cereais. Outros usos incluem sua aplicação como matéria-prima para a fabricação de surfactantes e quelantes, para a síntese do ácido fólico e em outros produtos farmacêuticos como os shampoos. O ácido L-glutâmico é usado como um componente de nutrição enteral e parenteral. Ele tem a maior demanda de qualquer aminoácido excedendo 1,5 milhões de toneladas por ano mundialmente (MENDES, 2014; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2012 PUBCHEM, 2021).

O ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) é gerado a partir da reação química do metanoato de sódio à altas temperaturas (400 ^{0}C) e na presença de ácido sulfúrico. Industrialmente é utilizado em produtos anti-tártaro, anti-ferrugem e como componente de tintas esferográficas. É utilizando também como mordente e branqueador nos curtumes, e como clareador nas indústrias têxteis (ARAÚJO, 2013; PUBCHEM, 2021).

O ácido maleico ($C_4H_4O_4$) é um isômero cis do ácido 2-butenodioico ($C_4H_4O_4$) e o seu isômero trans, é o ácido fumárico ($C_4H_4O_4$). Este ácido é produzido industrialmente através da oxidação catalítica de benzeno sobre pentóxido de vanádio. Ele é utilizado em indústrias de tinturarias, têxtil, alimentícia e farmacêutica como na formulação de condicionadores de cabelo (BARCELLOS, 2009; PUBCHEM, 2021).

O ácido tartárico ($C_4H_6O_6$) é fabricado a partir da reação de anidrido maleico com peróxido de hidrogênio. Sua principal aplicação é como acidulante e conservante nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e bebidas. Tem ampla aplicação em sucos, refrescos, refrigerantes e também em shampoos (SEQUEIRA, 2012; PUBCHEM, 2021).

O ácido succínico ($C_4H_6O_4$) é produzido industrialmente através da fermentação de carboidratos por bactérias (*Anaerobiospirillum succiniciproducens* e *Actinobacillus succinogenes)* e leveduras. Pode ser obtido também pela hidrólise ácida ou básica da succinonitrila, porém este processo produtivo foi reduzido nos últimos anos e novos processos isentos do uso de solventes derivados de petróleo estão sendo buscados. Sua principal aplicação industrial é como insumo para a fabricação de solventes, vernizes, perfumes, tintas, corantes e polímeros. O bioplástico polibutileno de succinato (PBS) é um dos polímeros produzido através do ácido succínico. Na indústria alimentícia, o ácido succiníco é utilizado como aromatizante e neutralizante de bebidas, tais como, refrigerantes, cervejas, entre outros. Na indústria farmacêutica é empregado em medicações destinadas ao tratamento de úlcera e protetores contra a radiação e também em produtos cosméticos como na formulação de descolorantes de cabelo. Ele também é utilizado como aditivo alimentar e suplemento dietético, seguro e aprovado pelo U.S. Food & Drug Administration (CASTRO, 2014; PUBCHEM, 2021; FDA, 2021).

O ácido malônico ($C_3H_4O_4$) é produzido industrialmente a partir do ácido cloroacético e o carbonato de sódio que formam o sal sódico. O sal sódico reage por sua vez com cianeto sódico, formando o cianoacetato. Este é hidrolisado com hidróxido de sódio, formando o ácido malônico. Sua principal aplicação é como precursor de polímeros como poliésteres e polímeros biodegradáveis, um dos maiores segmentos mundiais. Também é utilizado como insumos na fabricação de resinas usadas em revestimentos protetores de raios UV e processo oxidativos e corrosivos. O ácido malônico é amplamente empregado na indústria de tintas como um agente de reticulação para revestimentos automotivos de alto valor agregado. Outros produtos de alto valor agregado, incluindo os das indústrias de componentes eletrônicos, cosmética (aroma e fragrâncias) e farmacêutica, também utilizam o ácido malônico. Na indústria farmacêutica e

alimentícia, o ácido malônico é usado como conservante ou controlador de acidez em formulações e alimentos. O ácido malônico foi listado como um dos 30 principais produtos químicos a ser produzido a partir de biomassa pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (MAJZOOVI; BEPARVA, 2014; POLLAK; ROMEDER, 2005; PUBCHEM, 2021).

O ácido glicólico ($C_2H_4O_3$) é produzido sinteticamente através da reação do ácido cloroacético com o hidróxido de sódio. É empregado industrialmente como intermediador de sínteses orgânicas de diversas reações e produtos, incluindo a polimerização para a preparação do ácido poliglicólico e outros biopolímeros. Este ácido é empregado também na indústria têxtil, como agente pigmentador e curtidor, e na indústria alimentícia como agente flavorizante e conservante. O ácido glicólico é usualmente incluso nas formulações de solventes e aditivos para tintas e pinturas como melhorador de brilho. Devido ao seu excelente poder de absorção e ação como regulador de pH, o ácido glicólico tem várias aplicações em produtos de cuidados para a pele, como gel de limpeza e séruns (MILTENBERGER, 2005; GIGANTE; PEZZA, PEZZA, 2002; PUBCHEN, 2021).

Conforme apresentado, estes ácidos possuem vasta aplicação em diversos setores industriais e sua produção é feita através de processos fermentativos que são de difícil controle ou sínteses envolvendo reagentes derivados de petróleo, geralmente tóxicos. Sendo assim, métodos de obtenção alterativos destes compostos, como sua extração a partir da vinhaça, pode representar uma direção de aproveitamento para a vinhaça, um método sustentável de produção destas substâncias e uma contribuição para o desenvolvimento de tecnologias e processos verdes (CHEN; NIELSEN, 2016).

1.5. QUÍMICA VERDE (QV)

Nas últimas décadas, o desenvolvimento tecnológico de produtos, processos e práticas laboratoriais que eliminem ou minimizem os impactos ao meio ambiente e à saúde humana tem se tornando cada vez mais exigidos pelas agências regulamentadoras. Estes desenvolvimentos abrangem às diversas áreas de química e engenharia química e estão dentro do conceito de Química Verde (LENARDÃO et al., 2013).

De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a Química Verde é definida como: "A invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas" (TUNDO; CLACK; MEMOLI, 2000).

A química verde está baseada em 12 princípios entre eles a redução do consumo de recursos não renováveis, o uso de fonte renováveis de matéria prima, a eficiência energética, a eliminação e/ou redução do uso de substâncias nocivas e a minimização e tratamento dos resíduos gerados (EPA, 2021; MENEZES; SANTOS; BORTOLI, 2016; LENARDÃO et al., 2013).

Dentro destes princípios, a redução do consumo de recursos não renováveis tem sido estabelecida, especialmente dentro dos setores de energia e o agroindustrial, a partir da utilização de biomassas, como a cana-de-açúcar e seus derivados (YUSUF, 2017). Neste processo as biomassas são utilizadas como matéria-prima para fabricação de produtos e/ou são queimadas para a produção de energia, substituindo os tradicionais combustíveis fósseis. A biomassa pode ser proveniente de culturas cultivadas para esta finalidade e/ou dos resíduos agroindustriais destas culturas. Neste último caso, a utilização da biomassa também contribui para o princípio de minimização e tratamento dos resíduos gerados (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2014)

A utilização de biomassas provenientes de resíduos agroindustriais vem sendo aplicado nos últimos anos em diversos setores. Alguns exemplos são: produção de biocombustível a partir do caroço de pequi; produção de energia e bioetanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar; fabricação de cimentos e corretores de solo a partir dos resíduos do beneficiamento do arroz; fabricação de materiais isolantes e energia proveniente dos resíduos da casca de coco verde; produção de energia e aditivos para ração animal; e fabricação de fertilizantes provenientes da vinhaça (GUIMARÃES, 2015; VIANA; CRUZ, 2016).

Os resíduos agroindustriais estão se destacando também como uma promissora fonte de substâncias utilizadas como insumos e/ou princípios ativos. Neste processo além do aproveitamento e/ou tratamento do resíduo são obtidas substâncias que podem ser direcionadas a diversos setores industriais para a fabricação de produtos cotidianos, tais como, fármacos, cosméticos, nutracêuticos, produtos de limpeza, entre outros. Entre as substâncias amplamente utilizadas nos setores industrias e que estão sendo relatadas na literatura como presentes nestes resíduos estão os ácidos orgânicos. VAZ (2010) descreve o processo e hidrólise de resíduos da produção da celulose e a hemicelulose, decompondo-os em diversos insumos, entre eles os ácidos orgânicos o lático e o succínico.

Babei et al. (2019) e Hassan et al. (2019) também mostram a obtenção dos ácidos succínico e lático a partir da fermentação de resíduos alimentares e da casca de banana.

Yusuf (2017) mostra também a obtenção dos ácidos orgânicos lático e cítrico a partir do bagaço da cana-de-açúcar utilizando um processo de fermentação de fácil manipulação, boa estabilidade e de baixo consumo de energia

Além dos produtos e processos, a química verde engloba também às práticas laboratoriais. Neste contexto o principal princípio a ser aplicado é a minimização ou eliminação de reagentes e resíduos nocivos.

Os reagentes e resíduos são, respectivamente, consumidos e gerados em grandes quantidades nas rotinas dos laboratórios, especialmente em sínteses químicas e em algumas técnicas de análise. Desta forma o uso de reagentes alternativos, denominados de solventes verdes, e o aperfeiçoamento de técnicas de análise vêm permitindo uma melhor aderência aos princípios da química verde (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012).

Com relação aos solventes verdes, diferentemente dos reagentes tradicionais que são frequentemente tóxicos ou clorados, os solventes verdes são geralmente derivados de recursos renováveis e biodegradáveis e são produtos inócuos, muitas vezes de ocorrência natural. Pesquisas tem mostrado a viabilidade de uso destes solventes alternativos com a mesma eficiência e, muitas vezes, como os mesmos ou menores custos. Com exemplos destes solventes pode-se citar ésteres metílicos de ácido graxo de origem de óleo vegetal, bioetanol, glicerol, líquidos iônicos derivados de sais de amônio e a água (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012).

No que diz respeito às novas ou aperfeiçoadas técnicas, aquelas que utilizam o princípio de miniaturização em seus componentes e no uso de insumos para a sua realização como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência, são as que mais se adequam à química verde. A miniaturização contribui para a redução de uso de solvente e reagentes de alta toxicidades, assim como a quantidade de resíduos gerados, energia e tempo de análises. O preparo das amostras também é reduzido, já que necessita um volume menor para análise, realizando uma microextração. A vinhaça por sua vez, já é um resíduo líquido que não necessita de uma etapa de extração da cana-de-açúcar (PLOTKA et al., 2013).

Esta técnica utiliza um volume reduzido de reagentes, quando comparada com outras técnicas de análises, e pode ser executada com eficiência utilizando solventes de baixa toxicidades como água e bioetanol (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; PLOTKA et al., 2013).

1.6. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

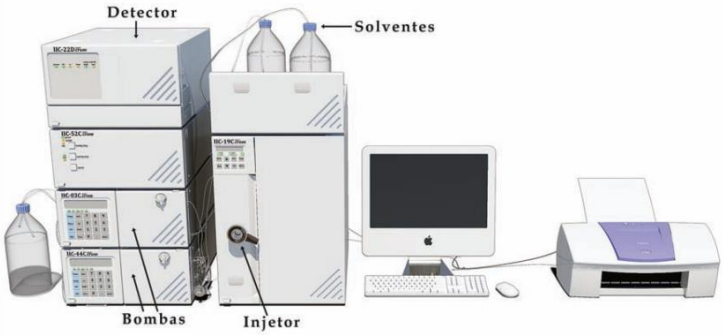
A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica instrumental da cromatografia que é amplamente utilizada em análises qualitativas e quantitativas, por ser uma técnica precisa e sensível para identificar e quantificar substâncias e apresentar boa confiabilidade e desempenho (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009).

O equipamento funciona a partir do bombeamento de alta pressão da fase móvel (FM), geralmente um solvente, até a coluna cromatográfica onde uma válvula de injeção injeta a amostra a ser analisada, que é conduzida pela FM através da coluna, um tubo de aço inox preenchido com adsorventes, chamado de fase estacionária (FE).

Existem diversos tipos de colunas disponíveis para o uso em CLAE, com diferentes características que são comprimento, diâmetro interno, fases, composição e o tamanho das partículas e dos poros desse enchimento. Todas elas influenciam na interação da amostra. Colunas tamanhos maiores geralmente apresentam melhores resoluções, porém atualmente há uma preferência por colunas menores pois a tecnologia atual permite uma boa resolução, menor uso de solventes e tempo de análise. O diâmetro da coluna, quanto menor ele for, menor o uso de baixo volume de solvente e tempo de análise (CMS, 2021).

Durante a eluição da amostra, as substâncias presentes na amostra vão se separando dependendo da afinidade com a FM e/ou FE. Cada substância é eluida separadamente e ao saírem da coluna, elas são direcionadas a um detector que emite sinais que são amplificados e transformados em dados através de um registrador. Atualmente os registradores consistem de computadores contendo softwares específicos. Este processamento gera um registro gráfico do sinal elétrico, produzido pelo detector, em função do tempo de análise, denominado de cromatograma (Figura 4) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; PRATA, MOGOLLON, AUGUSTO, 2016).

Figura 4 - Esquema CLAE



Fonte: LANÇAS, 2009

Um dos detectores mais utilizados é o detector UV-visível que analisa a amostra a partir de quanto de luz foi absorvida pelos analitos em diferentes comprimentos de onda, que pode ser um número fixo ou um intervalo do comprimento. Esse método é eficiente para análises de substâncias que são capazes de absorver radiação eletromagnética na região da luz visível (200 – 800 nm). Eles possuem um bom custo-benefício já que comparado a outros detectores, ele é mais barato e possuem uma aplicabilidade em diversas áreas. Ele pode ser acoplado com outros detectores, sem interferir nos demais (LATIF; SARKER, 2012; LEDER; PORCU, 2018).

Outro detector que se destaca, é o espectrômetro de massas, ele permite a identificação de compostos sem a necessidade de padrões analíticos. Nesse tipo de detector, os compostos da amostra são ionizados, gerando íons que são separados pela sua relação massa/carga (*m/z*) e um cromatograma de abundância x m/z é gerado. A ionização mais comum é por eletrospray (ESI), onde as substâncias a serem analisadas são convertidas em spray e ionizadas. Ele pode ser utilizado em dois modos: o ESI+ (íon positivo), a ionização ocorre pela protonação; o ESI- (íon negativo), a ionização ocorre pela desprotonação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012)

Estudos publicados na literatura mostram que a CLAE é uma das técnicas mais utilizadas para a identificação de ácidos orgânicos em diferentes matrizes. As análises dos ácidos geralmente são realizadas em cromatógrafos contendo detector UV-vis, pois os ácidos apresentam absorção na faixa UV com os máximos de absorção ocorrendo entre 210-254 nm. As colunas tipicamente utilizadas para estas análises são colunas aquosas, específicas para ácidos e/ou C18. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; SANTOS; SANTOS; AZEVEDO, 2014; FASCIANO; MANSOUR; DANIELSON, 2016; CAMPOS, 2002; HUANG et al., 2012; VIEIRA; RIBEIRO; RODRIGUES, 2020; IVANOVA-PETROPULOS; PETRUSEVA; MITREV, 2020).

Na vinhaça, poucos estudos estão disponíveis na literatura relatando a identificação de ácidos orgânicos. Em seu estudo BERNARDES et al., (2019), desenvolveu e validou um método para quantificar os ácidos ácido acético, ácido butírico, ácido capróico, ácido cítrico, ácido lático, ácido propiônico, ácido succínico, ácido valérico em vinhaça utilizando cromatografia líquida acoplada a um detector de índice de refração e uma coluna de exclusão de íons. SEDENHO et al., (2017) desenvolveu e validou os ácidos lático, málico e tartárico na vinhaça por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada e uma coluna específica de ácidos orgânicos.

Dentre as vantagens da CLAE, em relação às outras técnicas utilizadas para análise de ácidos orgânicos, uma que tem se destacado nos últimos anos é a sua melhor aderência aos princípios de Química Verde. Utilizando fases móveis de baixa toxicidade e baixo fluxo de solvente é possível tender ao princípio de redução do uso de solventes tóxicos e prevenção da formação de resíduos (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; PLOTKA et al., 2013).

1.7 ADSORÇÃO

A adsorção é um processo onde ocorre a concentração seletiva de uma substância presente em uma matriz líquida ou gasosa (adsorvato) ao entrar em contato com uma superfície sólida (adsorvente). É um processo espontâneo que ocorre em quatro etapas, sendo elas: i) transporte da solução da substância até a camada-limite ao redor do adsorvente; ii) difusão externa entre a camada-limite até os poros do adsorvente; iii) difusão interna das moléculas do adsorvato nos poros do adsorvente e iv) adsorção ou fixação adsortiva, que pode ocorrer de forma física (fisissorção) ou química (quimissorção) (TRAN et al., 2017).

A fisissorção ocorre quando as moléculas são fracamente ligadas a superfície, através de forças com as de Van der Waals e eletroestáticas. A quimissorção é quando há uma interação entre as moléculas com a superfície, havendo uma troca de elétrons, formando ligações químicas. Em qualquer um dos processos, para que ocorra uma boa adsorção é necessário um adsorvente adequado para o material que irá ser adsorvido.

Os adsorventes são materiais sólidos, porosos e com uma grande área de superfície, que permitem a adesão de moléculas do adsorvato em sua superfície. Essa adesão ocorre de acordo com a interação do adsorvato e do adsorvente, mas alguns fatores podem facilitar a adsorção, tais como, a área superficial, tamanho de poros; temperatura (aumento da temperatura pode permitir a entrada de moléculas maiores nos poros e permite uma maior difusão das moléculas); propriedades entre o adsorvente e o adsorvato como polaridade, carga, natureza físico química, tamanho das moléculas, pH, entre outros (NASCIMENTO et al., 2014).

Para adsorvatos que possuem cargas, como os ácidos orgânicos, utiliza-se adsorventes que realizam a troca iônica, denominadas de resinas de troca iônica. Esse tipo de resina são polímeros esféricos, geralmente de copolímeros de estireno ou divinil benzeno, que ao entrar em contato com um meio aquoso, se dissocia em íons: cátions, chamados de resinas catiônicas, ou ânions, chamados de resinas aniônicas. Esses íons são trocados com os íons da substância

de acordo com a suas características. As resinas catiônicas, geralmente apresentam grupos funcionais sulfônicos ou carboxilicos, enquanto as resinas aniônicas, geralmente apresenta grupo funcional aminas terciárias ou quartenários de amônio (KREMER, 2022).

A Purolite A400 é uma resina aniônica fortemente básica, com o grupo funcional de quartenário de amônio. Com forma iônica de cloreto (Cl^-), ela possui esferas de 300 - 1200 µm e é altamente empregada na indústria, principalmente para a remoção de sílica e desmineralização de água. Ela possui certas vantagens como uma regeneração eficiente, uma alta capacidade operacional e um bom desempenho cinético (PUROLITE, 2022).

1.8 MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

As isotermas de adsorção são modelagens matemáticas descrita em curvas que quantificam a adsorção de um adsorvato por um adsorvente, em temperatura constante. Ela também indica: como o adsorvente irá adsorver o adsorvato, a estimativa da quantidade máxima de adsorvato que pode ser adsorvido, se ocorreu a purificação pretendida, e se esse adsorvente é acessível para purificar o adsorvato (LEANDRO-SILVA et al., 2020).

As isotermas podem ser classificadas como: lineares, côncavas e convexas. As isotermas lineares são aquelas que a quantidade do soluto adsorvido é proporcional à concentração do adsorvato e não apresenta a capacidade máxima. As isotermas côncavas são aquelas que a quantidade absorvida do soluto é alta em uma baixa concentração do fluido, sendo essas as favoráveis. Por fim, as isotermas convexas são aquelas que quantidade absorvida de soluto é baixa em uma baixa concentração do fluido, sendo essas desfavoráveis (MCCABE; SMITH; HARRIOT, 2001).

Elas também podem ser classificadas, segundo Giles, em quatro classes de acordo com a inclinação da curva: tipo S (Spherical), curvatura inicial para cima, devido interação fraca de adsorvente com adsorvato; L (Langmuir), inclinação curvatura inicial para baixo, devido baixo disponibilidade de sítios ativos; H (High affinity), caso especial da curva L, onde a superfície do adsorvente possui uma alta afinidade pelo soluto do adsorvato; e C (Constant partition), início linear, devido quantidade de sítios ativos são constantes (FALONE; VIEIRA, 2004).

Para descrever essas isotermas, existem diferentes modelos, porém os modelos mais comuns são de Langmuir e Freundlich, pois o modelo de Langmuir consegue calcular a

capacidade máxima de adsorção de um adsorvente, e ambos conseguem descrever o comportamento do adsorvente através de experimentos (NASCIMENTO et al., 2014).

A isoterma de equilíbrio de Langmuir propõe um modelo para superfícies simples, uniformes, infinitas e não porosa. Ela é um modelo teórico que correlaciona à quantidade de soluto adsorvido com a concentração do soluto na solução (NASCIMENTO et al., 2014).

Esse modelo é baseado em uma hipótese que a adsorção máxima ocorre em uma monomolecular, onde a superfície do adsorvente é energeticamente homogênea, contendo sítios ativos idênticos e finitos, um para cada molécula. Essas moléculas que são adsorvidas e as partículas adsorvidas não interagem entre si (NASCIMENTO et al., 2014).

A isotermia de Langmuir é representada pela Equação 1.

Equação 1 – Equação de Langmuir

$$q_e = \frac{q_{máx} x K_L x C_e}{1 + (K_L x C_e)}$$

Onde,

q_e = quantidade adsorvida por grama do adsorvente (mgg^{-1});

$q_{máx}$ = constante relacionada com a energia de adsorção (Lmg^{-1});

K_L = constante de Langmuir que dá a capacidade de adsorção teórica na monocamada (Lg^{-1});

C_e = concentração do adsorvato no equilíbrio (mgL^{-1})

Na Isotermia de Langmuir há o fator de separação ou parâmetro de equilíbrio (R_L), que classifica a isotermia em favorável, desfavorável, linear ou irreversível. Para a reação de adsorção ser favorável, o R_L tem que estar entre 0 e 1. Se esse valor for maior que 1, a adsorção é desfavorável e se for igual a zero é irreversível. Para descobrir o valor do parâmetro de equilíbrio, utilizasse a Equação 2 (PINHEIRO et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2014).

Equação 2 – Equação do fator de separação

$$R_L = \frac{1}{1 + (K_L \, x \, C_i)}$$

Onde,

C_i = concentração inicial do adsorvato (mgL^{-1})

A isoterma de equilíbrio de Freundlich é empírica, aplicada em sistemas em que a superfície do adsorvente não é homogênea e em multicamada. Ela correlaciona a quantidade do adsorvato com a capacidade de adsorção máxima do adsorvente. A equação 3 representa a equação de Freundlich (PINHEIRO et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2014).

Equação 3 – Equação de Freundlich

$$q_e = (K_F)x(C_e^{\frac{1}{n}})$$

Onde,

K_F = constante de Freundlich (mgg^{-1});

n = constante de intensidade de adsorção

Na isotermia de Freundlich há o valor da quantidade relativa dos sítios energéticos dos adsorventes (n) que classifica a isotermia em favorável ou desfavorável. Para a reação de adsorção ser favorável, o valor de n precisa estar entre 1 e 10. Se esse valor estiver fora do intervalo, ele é desfavorável (PINHEIRO et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2014).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Extração, identificação, quantificação dos ácidos orgânicos majoritários da vinhaça que possuem aplicação industrial

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise dos ácidos orgânicos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

- Identificação e quantificação dos ácidos majoritários da vinhaça

- Avaliação da capacidade adsortiva da resina iônica PuroliteA4000 pelos ácidos estudados, empregando modelos de isoterma de Languimir e Fiendlich

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Amostras de Vinhaças

Neste trabalho foram analisadas cinco amostras de vinhaça provenientes das usinas A (Araraquara - SP), safra de 2018/2019; B (Araras - SP), safra 2016/2017; C (Frutal - MG), safra de 2015/2016; D (Frutal - MG), safra de 2015/2016 e E (Araraquara - SP), safra de 2017/2018. Todas as amostras foram coletadas diretamente do duto de saída do destilador da usina, armazenadas em frascos âmbar em freezer até o momento de sua utilização.

3.2. Padrões Analíticos

Para o desenvolvimento do método foram utilizados padrões analíticos de diferentes ácidos orgânicos. Os ácidos trans-aconítico (grau de pureza 98 %), maleico (grau de pureza 99 %) e cítrico (grau de pureza 99 %) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. O ácido tartárico (grau de pureza 90 %) foi proveniente da empresa Nuclear. Os ácidos lático (grau de pureza 85-90 %), oxálico (grau de pureza 99 %), glutâmico (grau de pureza 99 %), málico (grau de pureza 99 %), succínico (grau de pureza 99 %) foram todos da marca Synth. O ácido glicólico (grau de pureza 70-72 %) foi proveniente da marca Dinâmica e o ácido malônico (grau de pureza 99 %) da marca Vetec.

3.3. Reagentes

Para a extração dos ácidos orgânicos da vinhaça foram utilizados metanol, grau PA da marca Quemis e água ultrapura proveniente do purificador Megapurity da Millipore Indústria e Comércio Ltda.

Para as análises cromatográficas foram utilizados os tampões fosfato de potássio monobásico anidro (Nuclear) e sulfato de amônio (Química Moderna), todos grau HPLC. Foram utilizados ainda ácido ortofosfórico da marca Vetec e metanol. Foi utilizado também acetado de amônio (Synth) e ácido fórmico (Sigma-Aldrich), grau PA.

Para a análise de adsorção utilizou-se uma resina aniônica A4000 (base de poliestireno e devilbenzeno), da marca Purolite.

3.4. Preparo das soluções dos padrões analíticos

Inicialmente foram preparadas soluções estoques na concentração de 1000 mgL^{-1}, pesando-se quantidades pertinentes de cada ácido e dissolvendo-os em água ultrapura. Estas soluções foram filtradas em membranas de politetrafluoretileno hidrofílico de poro 0,45 µm e diâmetro de 13 mm (marca Analítica) e analisadas por CLAE.

Visando obter picos dos ácidos acima do limite de detecção e dentro da escala máxima de absorção do detector, as concentrações de cada ácido foram posteriormente ajustadasnas soluções de trabalhos de cada um dos padrões ena solução de trabalho contendo a misturas de todos os padrões.. A Tabela 8 apresenta as concentrações finais de cada ácido utilizadas neste trabalho.

Tabela 8 – Concentrações dos ácidos orgânicos nas soluções estoque utilizadas nas análises por CLAE.

Ácido	**Concentrações (mgL^{-1})**
Cítrico	90,91
Malônico	90,91
Tartárico	90,91
Oxálico	22,73
Maleico	0,95
Glutâmico	90,91
Succínico	90,91
Lático	2,27
Málico	90,91
Aconítico	2,27
Glicólico	3,79

3.5. Desenvolvimento do método de análise dos ácidos orgânicos por CLAE (UV/DAD e LC-MS)

As análises por CLAE foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo líquido Prominence LC 20 AT, composto por um módulo de comunicação (CBM-20A), duas bombas (LC-20AD XR), injetor automático (SIL-20AXR), forno (CTO-20A), detector UV-vis/DAD (SPD-M20A); acoplado a um espectrofotômetro de massa, tipo quadrupolo, modelo LCMS-8030, todos da Shimadzu Corporation.

O desenvolvimento do método foi realizado com base nos métodos já descritos em literatura para os ácidos relatados na cana-de-açúcar (aconítico, cítrico, málico, lático, tartárico, oxálico, glutâmico, maleico, malônico, succínico e glicólico) e adaptado para a matriz vinhaça (MORALES et al, 2002; FAVERO, 2011; SERAFIM, 2010).

As melhores condições estabelecidas para CLAE-UV/DAD e LC-MS foram: coluna Shim-pack XR-ODS II (100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm); fase móvel 100% de uma solução tampão de 3mM fosfato de potássio monobásico/sulfato de amônio (5:1 g/g) com pH ajustado com ácido ortofosfórico para 2,1; injeção de 10 µL da amostra em um sistema cromatográfico de eluição isocrática empregando um fluxo de 0,2 mL/min a 20 ºC e com detecção de 210 nm. Voltagem do capilar de -3,5 kV; ionização por *electrospray* no modo negativo; temperatura da DL e do bloco de aquecimento de 250 ºC e 400 º C, respectivamente; e fluxo de gás de secagem e nebulizador (nitrogênio) de 15 e 3 $Lmin^{-1}$, respectivamente. O monitoramento foi realizado no modo *full scan*, no intervalo de massa/carga (*m/z) de* 10 à 500 Da, e no modo seletivo de íons (SIM) buscando os fragmentos específicos de cada ácido, de acordo com a Tabela 9 (BYLUND et al., 2007; FLORES; HELLÍN; FENOLL, 2012; ELGSTOEN, 2008; GRANT et al., 1996; LIU; ROCHFORT, 2013).

Tabela 9 – Fragmentos monitorado para cada ácido orgânico durante analises por LC-MS no modo SIM negativo

Ácido	**Íon molecular (*m/z*)**
Cítrico	191
Malônico	103
Tartárico	149
Oxálico	89
Maleico	115
Glutâmico	146
Succínico	117
Lático	89
Málico	133
Aconítico	173
Glicólico	75

Após a definição das melhores condições cromatográficas, obtidas a partir da análise dos padrões dos ácidos orgânicos, o método desenvolvido foi aplicado às amostras reais de vinhaça.

3.6. Extração dos ácidos da vinhaça

Para análise dos ácidos da vinhaça cada amostra de vinhaça foi submetida a um processo de pré-tratamento utilizando a Extração em Fase Sólida (EFS).

A EFS é um mecanismo de separação líquido-sólido que permite a extração de compostos como analitos não voláteis, semivoláteis e mostras sólidas que passaram por um processo de extração prévia com um solvente (JARDIM, 2010).

Inicialmente 13 mL das amostras foram descongeladas e centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi então submetido ao processo de EFS utilizando cartucho Strata™-X-A, 33 µm, 85 Å, 100 mg, da marca Phenomenex, previamente condicionados com 1 mL de metanol seguido por 1 mL de água ultrapura. Após o condicionamento, 3 mL do sobrenadante da vinhaça foi adicionado ao cartucho. Efetuou-se a lavagem do cartucho com 1 mL de uma solução de acetato de amônio à 25 mmol L^{-1} (pH 6-7) seguido por 1 mL de metanol. Eluiu-se o cartucho com quatro alíquotas de 500 µL de uma solução de ácido fórmico 5 % em metanol.

Para a definição do protocolo de extração e lavagem do cartucho, a fração de vinhaça obtida após a passagem pelo cartucho, bem como a solução obtida pela lavagem do cartucho foram individualmente analisadas por CLAE. Estas frações não apresentaram teor de ácidos detectável pelo método, confirmando a efetividade de retenção dos ácidos no cartucho. Para definição do volume de solvente a ser utilizado no processo de eluição, seis alíquotas de 500 µL da solução de ácido fórmico 5 % em metanol foram inicialmente passadas pelo cartucho e analisada individualmente por CLAE. Como as últimas duas frações não apresentaram teor de ácidos detectável pelo método, definiu-se o protocolo de eluição com quatro alíquotas de 500 µL como suficiente para a eluição dos ácidos do cartucho.

Em virtude da diferença de teor de cada ácido nas vinhaças, foi definido um protocolo de diluição em água para as frações ácidas analisadas por CLAE, de forma a se obter a melhor eficiência e resolução cromatográfica. Em relação à vinhaça bruta, as diluições adotadas foram as proporções de vinhaça:água de 1:9 (v/v), 1:10 (v/v), 1:18 (v/v), 1:50 (v/v) e 1:200 (v/v) para as frações ácidas das vinhaças das usinas E, C, A, D e B, respectivamente. Todas as frações ácidas obtidas pelo processo de extração por EFS foram previamente filtradas em membrana 0,45 µm antes da análise por CLAE (MAPA, 2019).

3.7. Validação do Método de Análise dos Ácidos Orgânicos na Vinhaça por CLAE

A validação do método foi realizada a partir dos parâmetros estabelecidos na ICH abrangendo os seguintes parâmetros: exatidão, precisão, linearidade e intervalo, seletividade, repetibilidade, robustez, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Todos os parâmetros da validação foram avaliados utilizando as próprias amostras de vinhaça a fim evitar o efeito de matriz.

A seletividade foi avaliada nas frações ácidas de todas as amostras de vinhaça estudadas. Para a validação dos demais parâmetros, utilizou-se uma vinhaça especifica para cada ácido. Para os ácidos malônico, lático, glicólico e málico foi utilizada uma amostra diluída da vinhaça E. Esta vinhaça foi escolhida, pois os dois primeiros ácidos não estão presentes na sua composição e os outros quatro ficaram presentes em concentração abaixo do limite de quantificação (LQ) do método, utilizando o fator de diluição empregado (1,8 mL de vinhaça para 100 mL de água). Para os ácidos tartárico/oxálico e aconítico também foi utilizada vinhaça E, no entanto com um fator de diluição maior (1,4 mL de vinhaça para 200 mL de água, para os ácidos tartárico/oxálico e 1,0 mL de vinhaça para 250 mL de água para o ácido aconítico) para que os mesmos ficassem abaixo do LQ. Para a validação do método para os ácidos glutâmico, cítrico, succínico e maleico utilizou-se a vinhaça D, pois esta vinhaça não apresentou estes ácidos em sua composição.

A seletividade do método foi determinada através de recurso específico do software LabSolution que determinou o índice de pureza do pico de cada ácido em cada uma das amostras de vinhaça estudadas. Este índice de pureza é determinado pelo software analisando o espectro UV-vis em diferentes pontos de cada pico. Quando não são encontradas variações significativas, o software adota que o pico contém apenas uma substância, apresentando um índice de pureza de 1,0. Se forem detectadas diferenças no perfil UV-vis, o grau de variação é calculado e expresso com valores de índice de pureza baixo de 1,0.

O limite de detecção (LD), e o limite de quantificação (LQ) foram determinados pelo cálculo da razão sinal/ruído. Uma relação sinal ruído 3:1 foi considerada para estimar o LD e uma relação sinal ruído de 10:1 foi considerada para o LQ.

A linearidade do método foi determinada através da construção da curva de calibração de cada um dos ácidos. Esta curva de calibração foi efetuada através da fortificação das vinhaças E ou D com cinco concentrações diferentes do padrão analítico de cada ácido e da análise em triplicata de cada uma destas concentrações. As concentrações foram determinadas em função da faixa de trabalho (teores dos ácidos previamente determinados em cada amostra de vinhaça, considerando os respectivos fatores de diluição descritos no item 3.6. Extração dos ácidos da vinhaça), o LOQ e a margem de, pelo menos, 120 % da faixa de trabalho. Na Tabela 10 estão apresentadas as concentrações adotadas para a construção da curva de calibração de cada um dos ácidos.

Tabela 10 – Concentração dos ácidos para a construção da curva de calibração

Ácido	**Concentração 1 (mgL^{-1})**	**Concentração 2 (mgL^{-1})**	**Concentração 3 (mgL^{-1})**	**Concentração 4 (mgL^{-1})**	**Concentração 5 (mgL^{-1})**
Glutâmico	0,90	5,10	10,8	15,10	20,40
Glicólico	0,05	0,12	0,22	0,36	0,51
Tartárico/ Oxálico	0,51	1,00	10,50	52,60	93,50
Málico	0,36	2,20	5,40	10,50	23,80
Malônico	0,92	2,20	6,70	10,30	18,70
Lático	0,06	0,21	0,63	1,10	2,10
Cítrico	0,7	2,20	5,60	12,10	18,70
Succínico	1,86	4,30	8,80	12,10	18,70
Maleico	0,015	0,03	0,05	0,12	0,23
Aconítico	0,01	1,30	5,40	10,70	27,20

Para avaliar a repetibilidade, precisão intermediária e exatidão dos métodos, as amostras diluídas de vinhaças E e D foram fortificadas individualmente com seus respectivos ácidos. Três diferentes níveis de concentração (baixo, médio e alto) foram utilizados para a fortificação, sendo os valores de concentração definidos em função da faixa de trabalho (Tabela 10).

A repetibilidade foi avaliada preparando-se as soluções dos três níveis de concentração e analisando cada nível em triplicata no mesmo dia e utilizando o mesmo operador. Os resultados destas análises foram utilizados para a determinação da exatidão do método. Considerou-se a concentração da fortificação como 100 % e as concentrações obtidas das análises destas soluções resultaram na determinação das taxas de recuperação de cada ácido.

A precisão intermediaria foi avaliada preparando-se e analisando em triplicata novas soluções dos três níveis de concentração em dia consecutivo ao da repetibilidade.

3.8. Quantificação dos Ácidos Orgânicos na Vinhaça

A quantificação dos ácidos presentes nas amostras de vinhaça foi realizada por meio das curvas de calibração construídas usando as amostras das usinas E e D, em 5 concentrações diferentes de cada uma em triplicata seguindo os parâmetros estabelecidos do International Concil for Harmonication (ICH, 2005). A partir da curva, foi possível quantificar as amostras de vinhaça.

3.9 Experimentos de isoterma de adsorção

Para realizar os experimentos de isoterma utilizou-se a resina aniônica PuroliteA400. Inicialmente a resina foi submetida ao processo de eliminação de impurezas adsorvidas através de sete lavagens sequenciais com água ultrapura. Posteriormente a resina foi seca em dessecador onde permaneceu até o momento de sua pesagem e utilização.

Para a construção das curvas de isoterma utilizou-se 25 mL de vinhaça da usina D, preparada conforme descrito no item 3.6 e diluídas com água para obtenção de cinco concentrações diferentes. As proporções de vinhaça:água utilizada nas diluições foram de 1:20 (v/v), 1:30 (v/v); 1:40 (v/v), 1:50 (v/v) e 1:60 (v/v). O pH de todas as soluções foi ajustado para 3,4 com ácido ortofosfórico Cada solução foi misturada com 0,2 g de resina e agitada em temperatura ambiente a 200 rpm.. Após o tempo de agitação, alíquotas foram coletadas, filtrada em membrana 0,45 µm e analisada por CLAE (ALENCAR et al., 2017).

Para definição do melhor tempo de agitação foi realizado um estudo de cinética de adsorção. Neste estudo 25 mL de uma solução de vinhaça diluída com água na proporção 1:20 (v/v) vinhaça:água foi colocada em contato com 0,2 gramas da resina PuroliteA400 e agitada em temperatura ambiente numa rotação de 200 rpm, durante 2 horas. Alíquotas foram retiradas a cada 30 minutos, filtrada em membrana 0,45 µm e analisada por CLAE. Para o ácido aconítico, o estudo de cinética foi refeito adotando o tempo máximo de agitação de 30 minutos e alíquotas sendo retiradas a cada 5 minutos.

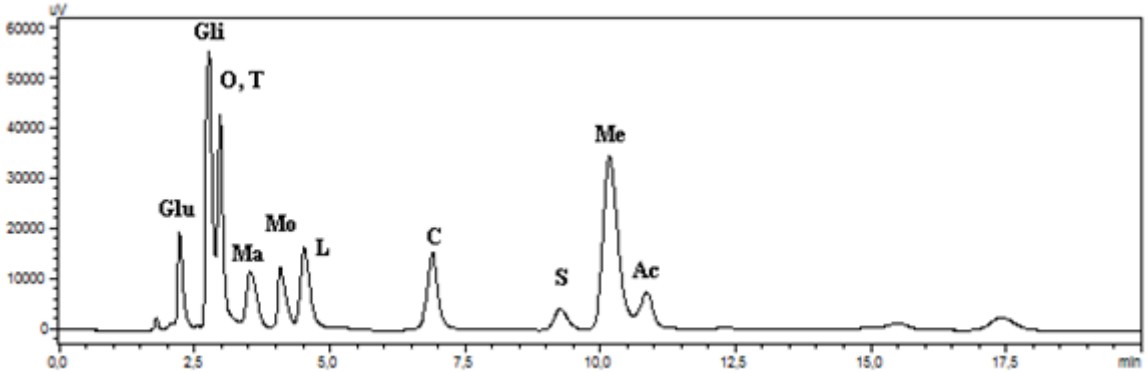
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do método e análise dos ácidos orgânicos por CLAE-UV e LC-MS

A adaptação das condições cromatográficas já descritas na literatura para ácidos orgânicos em diferentes matrizes (BERNARDES et al., 2019; MAPA, 2019) permitiu a obtenção de uma metodologia que apresentou uma separação satisfatória para os ácidos orgânicos da vinhaça (Figura 5), bem como atende aos princípios da química verde quanto à utilização de solventes menos tóxicos e a minimização do volume de resíduos de solvente produzido.

Conforme apresentado na Figura 5, apenas os ácidos oxálico e tartárico apresentaram coeluição no tempo de retenção (TR) de 3 min, enquanto os demais ácidos eluiram com resolução e eficiência satisfatórias.

Figura 5 – Cromatograma CLAE-UV da mistura de 11 padrões dos ácidos orgânicos: aconítico (A), cítrico (C), succínico (S), málico (Ma), maleico (Me), malônico (Mo), tartárico (T), oxálico (O), glutâmico (Glu), lático (L) e glicólico (Gli). Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm



Para a identificação do tempo de retenção de cada ácido, foi realizada inicialmente uma análise das soluções individuais de cada ácidos e posteriormente da solução contendo a mistura de ácidos. Durante estas análises constatou-se um pequeno deslocamento no TR dos picos quando analisados individualmente e na mistura. Constatou-se também que, apesar de se ter trabalhado com padrões analíticos com alto grau de pureza, os ácidos aconítico e tartárico apresentaram mais de um pico em seus respectivos cromatogramas. Desta forma, para a determinação confiável dos TR de cada ácido, bem como a sua inequívoca identificação realizou-se análises por LC-MS.

O íon molecular $[M-H]^-$, bem como os fragmentos obtidos permitiram a identificação dos onze ácidos estudados.

Para o ácido tartárico, o seu íon molecular ($[M-H]^- = 149$) e fragmentos correspondentes foi detectado no TR = 3 min. O pico adicional, visualizado em 17,4 min, apresentou $[M-H]^- = 195$ não correspondendo a nenhum dos ácidos estudados .

Para o ácido aconítico, os dois picos observados na análise prévia por CLAE-UV (TR = 10,8 e 15,5 min) apresentaram, no LC-MS, fragmentos correspondentes ao seu íon molecular ($[M-H]^- = 173$). Considerando que a abundância dos picos está relacionada com a sua concentração e que o padrão analítico utilizado apresenta pureza de 98 % de ácido aconítico,

atribuiu-se ao pico de maior intensidade (TR = 10,8 min) a identificação de ácido aconítico. O pico de TR = 15,5 min foi correlacionado à presença do aconitato. O aconitato, base conjugada do ácido aconítico, já está relatado na literatura com um derivado do ácido aconítico em canas imaturas (tanto nos colmos quanto nas folhas e pontas). Os sais de aconitato de cálcio ou magnésio também têm sido relatados como os principais derivados do ácido aconítico durante a clarificação do caldo (HONIG, 1963; ZAPATA, 2007; REECE, 2003; ARAÚJO, 2017).

4.2. Validação do método CLAE-UV/DAD

Com a definição de uma metodologia CLAE-UV/DAD eficiente para a separação de todos os ácidos orgânicos relatado para a vinhaça, foi realizada a validação do método abrangendo os parâmetros: exatidão, precisão, linearidade, seletividade, repetibilidade, LD e LQ.

O teste de seletividade mostrou que o método desenvolvido é seletivo para todos os ácidos estudados, com exceção dos ácidos tartárico e oxálico. O pico que corresponde à coeluição destes ácidos foi o único que apresentou índice de pureza abaixo de 0,9, o que já era esperado uma vez que esses ácidos apresentam espectros UV-Vis diferentes. Para todos os demais picos o índice de pureza determinado ficou dentro da faixa aceitável de 0,974-1,000 demonstrando que os respectivos picos são puros.

O intervalo de LD e LQ obtido foi, respectivamente, de 0,004-0,522 mgL^{-1} e 0,014-1,741 mgL^{-1}, ficando abaixo da concentração mínima determinada para a curva de calibração e dentro da faixa de trabalho. Os valores de LD e LQ para cada ácido está apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores de LD e LQ para cada ácido analisado por CLAE

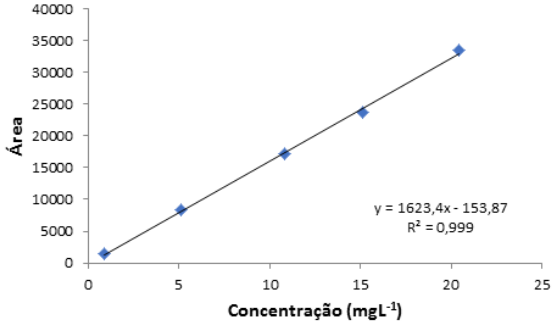
Ácidos	**LD (mgL^{-1})**	**LQ (mgL^{-1})**
Glutâmico	0,25	0,84
Glicólico	0,01	0,04
Tartárico/Oxálico	0,07	0,24
Málico	0,11	0,35
Malônico	0,26	0,86
Lático	0,01	0,05
Cítrico	0,17	0,57
Succínico	0,52	1,74
Maleico	0,004	0,014
Aconítico	0,02	0,08

Todos os ácidos estudados apresentaram linearidade na faixa de trabalho avaliada (Tabela 12) com seus valores de coeficientes de correlação sendo superiores a 0,996, em acordo com o valor mínimo preconizado pela norma ICH (R^2 = 0,990). As curvas de calibração de cada um dos ácidos, contendo os coeficientes de correlação e as respectivas equações da reta estão apresentadas nas Figura 6 - 8.

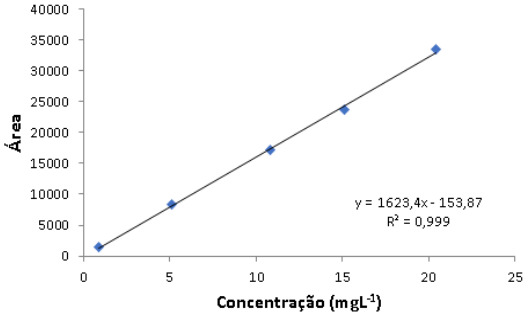
Tabela 12 – Faixa de linearidade para cada ácido analisado por CLAE

Ácidos	**Faixa de Linearidade (mgL^{-1})**
Glutâmico	0,9 – 12,0
Glicólico	0,05 – 0,3
Tartárico/Oxálico	0,51 – 55,0
Málico	0,36 – 14,0
Malônico	0,92 – 11,0
Lático	0,06 – 1,0
Cítrico	0,70 – 13,0
Succínico	1,86 – 11,0
Maleico	0,02 – 0,2
Aconítico	0,10 – 16,0

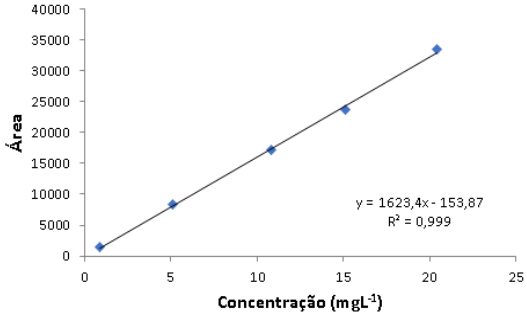
Figura 6 - Curva de calibração do: (a) ácido glicólico na faixa de concentração 0,05-0,51 mg.L^{-1}; (b) ácido tartárico/oxálico na faixa de concentração 0,51-93,5 mg.L^{-1} ; ácido glutâmico na faixa de concentração 0,9-20,4 mg.L^{-1}; ácido málico na faixa de concentração 0,36-23,8 mg.L^{-1}



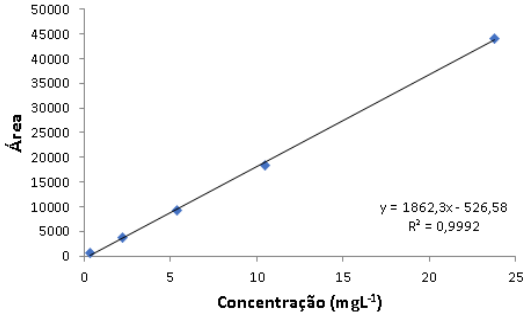
(a)



(b)

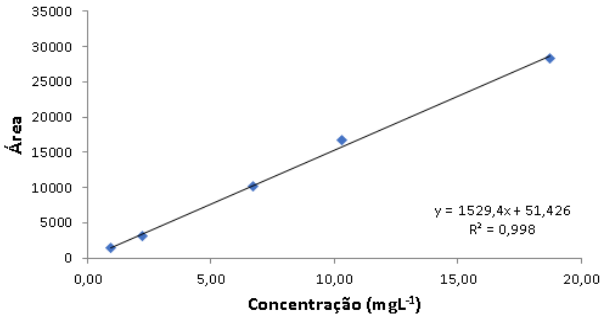


(c)

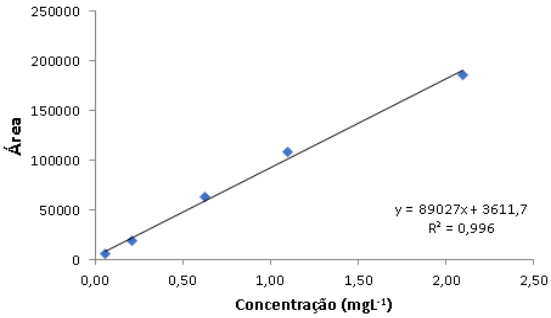


(d)

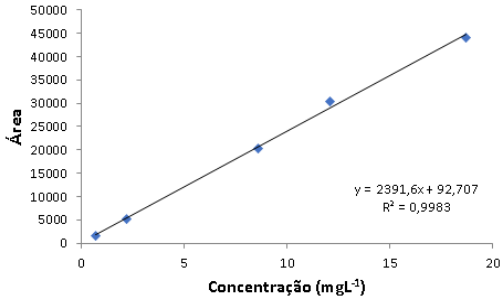
Figura 7 - Curva de calibração do: (a) ácido malônico na faixa de concentração 0,92-18,7 mg.L^{-1}; (b) ácido lático na faixa de concentração 0,06-2,1 mg.L^{-1} ; ácido cítrico na faixa de concentração 0,7-18,7 mg.L^{-1}; ácido succínico na faixa de concentração 1,86-18,7 mg.L^{-1}



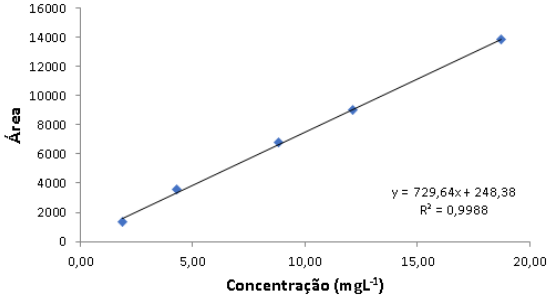
(a)



(b)

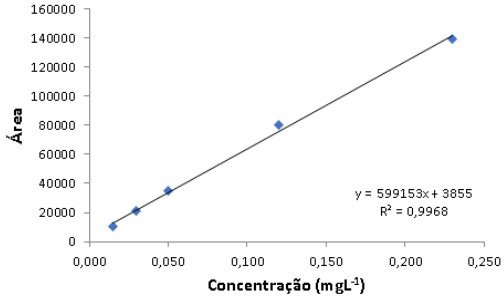


(c)

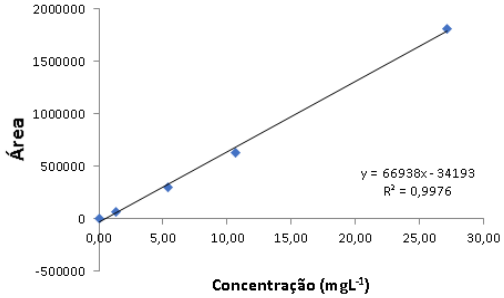


(d)

Figura 8 - Curva de calibração do: (a) ácido maleico na faixa de concentração 0,015-0,23 mg.L^{-1}; (b) ácido aconítico na faixa de concentração 0,01-27,2 mg.L^{-1}



(a)



(b)

Os resultados encontrados para a repetibilidade, precisão intermediária e exatidão de cada um dos ácidos analisados ficaram dentro dos valores estabelecidos pela ICH que estabelece um DPR < 5% para repetibilidade e precisão intermediária e uma faixa de

recuperação de 100±5% para a exatidão com DPR < 5%. Nas Tabelas 13 - 22 são apresentados os dados de repetibilidade, precisão intermediária e exatidão obtidos.

Tabela 13 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido glutâmico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do Glutâmico	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
1,0	0,98 0,95 0,98	0,97 ± 0,02	0,98 0,95 0,98 0,98 0,96 0,98	0,97 ± 0,01	0,98 0,95 0,98	98,00 95,00 98,00	97,00 ± 1,73
10,80	10,30 10,60 10,60	10,50 ± 0,17	10,30 10,60 10,60 10,60 10,80 10,70	10,60 ± 0,17	10,30 10,60 10,60	95,37 98,15 98,15	97,22 ± 1,60
20,40	20,10 19,80 20,10	20,00 ± 0,17	20,10 19,80 20,10 20,05 20,10 20,10	20,04 ± 0,12	20,10 19,80 20,10	98,53 97,06 98,53	98,04 ± 0,85

Tabela 14 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido málico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do málico	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
0,50	0,50 0,48 0,50	0,49 ± 0,01	0,50 0,48 0,50 0,48 0,48 0,50	0,49 ± 0,01	0,50 0,48 0,50	96,00 96,00 100,00	97,33± 2,31
5,40	5,19 5,34 5,20	5,24 ± 0,08	5,19 5,34 5,20 5,20 5,34 5,20	5,25 ± 0,07	5,19 5,34 5,20	96,11 98,89 96,30	97,10 ± 1,55
23,80	23,50 23,12 22,97	23,20 ± 0,27	23,50 23,12 22,97 23,67 23,54 23,40	23,37 ± 0,27	23,50 23,12 22,97	98,74 97,14 96,51	97,46 ± 1,15

Tabela 15 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido cítrico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do cítrico	Repetibilidade (n=3)		Precisão Intermediária (n=6)		Exatidão (n=3)		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	Média ± DPR	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	Média ± DPR	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	Recuperação (%)	Média ± DPR (%)
1,1	1,05	1,06 ± 0,01	1,05	1,06 ± 0,01	1,05	95,45	96,36 ± 0,91
	1,06		1,08		1,06	96,36	
	1,07		1,07		1,07	97,27	
			1,05				
			1,05				
			1,06				
08,60	8,30	8,33 ± 0,06	8,30	8,33 ± 0,05	8,30	96,51	96,90 ± 0,67
	8,40		8,40		8,40	97,67	
	8,30		8,30		8,30	96,51	
			8,40				
			8,30				
			8,30				
18,70	17,90	18,27 ± 0,32	17,90	18,20 ± 0,30	17,90	95,72	97,68 ± 1,72
	18,50		18,50		18,50	98,93	
	18,40		18,40		18,40	98,40	
			17,90				
			18,00				
			18,50				

Tabela 16 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido aconítico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do aconítico	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
0,02	0,02	0,02 ± 0,00	0,02	0,02 ± 0,00	0,02	85,00	86,67 ± 2,89
	0,02		0,02		0,02	85,00	
	0,02		0,02		0,02	90,00	
			0,02				
			0,02				
5,22	5,22	5,27 ± 0,05	5,22	5,28 ± 0,04	5,22	96,67	97,53 ± 0,93
	5,26		5,26		5,26	97,41	
	5,32		5,32		5,32	98,52	
			5,33				
			5,25				
			5,30				
26,90	26,90	26,93 ± 0,25	26,90	27,01 ± 0,19	26,90	98,90	99,02 ± 0,93
	26,70		26,70		26,70	98,16	
	27,20		27,20		27,20	100	
			27,00				
			27,12				
			27,14				

Tabela 17 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido glicólico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do glicólico	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
0,07	0,07		0,07		0,07	97,14	
			0,07				
	0,07	0,07 ± 0,00	0,07	0,07 ± 0,00	0,07	95,71	97,62 ± 2,18
			0,07				
	0,07		0,7		0,07	100,00	
			0,07				
0,22	0,21		0,21		0,21	95,45	
			0,22				
	0,22	0,22 ± 0,01	0,22	0,22 ± 0,01	0,22	100,00	98,48 ± 2,62
			0,21				
	0,22		0,21		0,22	100,00	
			0,22				
0,51	0,49		0,49		0,49	96,08	
			0,50				
	0,50	0,49 ± 0,01	0,48	0,49 ± 0, 1	0,50	98,04	96,08 ± 1,96
			0,49				
	0,48		0,48		0,48	94,12	
			0,48				

Tabela 18 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido malônico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do malônico	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
1,10	1,00	1,02 ± 0,03	1,00	1,04 ± 0,03	1,00	90,91	93,03 ± 2,29
	1,05		1,05		1,05	95,45	
	1,02		1,02		1,02	92,73	
			1,05				
			1,07				
			1,05				
6,70	6,50	6,53 ± 0,06	6,50	6,55 ± 0,05	6,50	97,01	97,51 ± 0,86
	6,50		6,50		6,50	97,01	
	6,60		6,60		6,60	98,51	
			6,50				
			6,60				
			6,60				
18,70	17,90	18,00 ± 0,10	17,90	18,015 ± 0,22	17,90	95,72	96,26± 0,53
	18,10		18,10		18,10	96,79	
	18,00		18,00		18,00	96,26	
			18,10				
			18,30				
			18,50				

Tabela 19 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido succínico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do succínico	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
2,30	2,20	2,23 ± 0,04	2,20	0,97 ± 0,01	2,20	95,65	96,96 ± 1,57
	2,27		2,27		2,27	98,70	
	2,22		2,22		2,22	96,52	
			2,24				
			2,29				
			2,25				
8,80	8,50	8,70 ± 0,17	8,50	8,68 ± 0,12	8,50	96,59	98,86 ± 1,97
	8,80		8,80		8,80	100,00	
	8,70		8,70		8,70	100,00	
			8,56				
			8,70				
			8,69				
18,70	18,10	18,20 ± 0,10	18,10	18,32 ± 0,17	18,10	96,79	97,33 ± 0,53
	18,30		18,30		18,30	97,86	
	18,20		18,20		18,20	97,33	
			18,60				
			18,40				
			18,30				

Tabela 20 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão da coeluição dos ácidos oxálico e tartárico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) dotartárico/ oxálico	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
0,98	0,95		0,95		0,95	96,94	
			0,96				
	0,96	0,96 ± 0,01	0,96	0,96 ± 0,01	0,96	97,96	97,62 ± 0,59
			0,96				
	0,96		0,97		0,96	97,96	
			0,96				
10,50	10,00		10,00		10,00	95,24	
			10,50				
	10,50	10,20 ± 0,26	10,10	10,19 ± 0,22	10,50	100,00	97,14 ± 2,52
			10,07				
	10,10		10,04		10,10	96,19	
			10,44				
93,50	93,50		93,50		93,50	100,00	
			92,90				
	92,90	92,33 ± 1,53	90,60	92,57 ± 1,01	92,90	99,36	98,75 ± 1,64
			92,60				
	90,60		92,80		90,60	96,90	
			93,00				

Tabela 21 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido lático

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do lático	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
0,10	0,10	0,10 ± 0,00	0,10	0,10 ± 0,00	0,10	98,00	97,00 ± 1,00
	0,10		0,10		0,10	97,00	
	0,10		0,10		0,10	96,00	
			0,10				
0,63	0,60	0,61 ± 0,01	0,60	0,61 ± 0,01	0,60	95,24	96,30 ± 1,83
	0,62		0,62		0,62	98,41	
	0,60		0,60		0,60	95,24	
			0,61				
2,10	2,10	2,03 ± 0,06	2,10	2,03 ± 0,04	2,10	100,00	96,83 ± 2,75
	2,00		2,00		2,00	95,24	
	2,00		2,07		2,00	95,24	
			2,01				
			2,02				

Tabela 22 - Repetibilidade, precisão intermediária, e exatidão do ácido maleico

Concentração Teórica (mgL^{-1}) do maleico	**Repetibilidade (n=3)**		**Precisão Intermediária (n=6)**		**Exatidão (n=3)**		
	Conteúdo calculado (mgL^{-1})	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Média ± DPR**	**Conteúdo calculado (mgL^{-1})**	**Recuperação (%)**	**Média ± DPR (%)**
0,02	0,02	0,02 ± 0,00	0,02	0,02 ± 0,00	0,02	95,00	95,00 ± 0,00
	0,02		0,02		0,02	95,00	
	0,02		0,02				
	0,02		0,02		0,02	95,00	
			0,02				
0,05	0,05	0,05 ± 0,00	0,05	0,05 ± 0,00	0,05	96,00	97,33 ± 2,31
	0,05		0,05		0,05	96,00	
	0,05		0,05				
	0,05		0,05		0,05	100,00	
			0,05				
0,23	0,22	0,22 ± 0, 1	0,22	0,22 ± 0,00	0,22	95,65	97,10 ± 2,51
	0,23		0,23		0,23	100,00	
	0,22		0,22				
	0,22		0,22		0,22	95,65	
			0,22				

4.3. Análise Qualitativa dos Ácidos Orgânicos na Vinhaça

A partir do estabelecimento do método de separação da identificação dos ácidos e definição de seu respectivo TR foi realizada a análise das cinco amostras de vinhaça. A comparação do TR dos picos presentes nos cromatogramas das vinhaças com os da mistura dos padrões analíticos permitiu a identificação de alguns dos ácidos nessas amostras (Figura 9 – 13).

Dentre os ácidos analisados, os ácidos aconítico, málico e glicólico foram os mais recorrentes, estando presente em todas as amostras de vinhaça analisada. Este resultado corrobora com dados da literatura onde o ácido aconítico é relatado como principal ácido do

caldo da cana-de-açúcar (cerca de 84 %) seguido pelo ácido málico (14 %) (GUITIERREZ; FERRARI; ORELLI JR, 1989). O ácido glicólico também tem sido relatado como abundante em algumas plantas como a cana-de-açúcar (HENRIQUES et al., 2007).

Em todas as amostras de vinhaça foi constatada também a presença de um pico com TR correspondente ao dos ácidos oxálico e tartárico, porém como estes ácidos coeluíram na metodologia desenvolvida, não foi possível identificar qual dos dois estavam presentes nas amostras. De acordo com dados da literatura, ambos os ácidos se encontram em abundância e frequência similares no caldo da cana-de-açúcar (oxálico e tartárico na concentração de 40-200 e 10-180 mgL^{-1}/matéria seca, respectivamente) (ARAÚJO, 2017) e, portanto, ambos podem estar representando o pico encontrado.

Os ácidos glutâmico, cítrico e lático, apesar de não estarem presentes em todas as vinhaças, também se demonstraram bastante frequente, sendo detectados em pelo menos 4 das amostras analisadas. Os ácidos glutâmico e cítrico foram identificados nas vinhaças das usinas E, C, A e B enquanto o lático foi identificado nas vinhaças das usinas D, C, A e B.

Os ácidos malônico e maleico foram os menos frequentes sendo encontrados apenas em duas das vinhaças analisadas (malônico detectado nas vinhaças das usinas de C e D e o maleico encontrado nas vinhaças das usinas C e E).

Os ácidos glutâmico, cítrico e malônico têm sido reportados como dependentes do grau de maturidade da cana e o ácido lático dependente do processo de produção ao qual o caldo de cana é submetido (GUTIERREZ; FERRARI; ORELLI JR, 1989).

Considerando que as amostras de vinhaça analisadas são de locais e safras diferentes elas podem ter sido provenientes de cana com diferentes estágios de maturação justificando a ausência dos ácidos glutâmico, cítrico e malônico em algumas das vinhaças.

Da mesma forma, por serem provenientes de diferentes usinas, a diferença em relação ao ácido lático pode estar relacionada à prováveis variações do processo produtivo existentes entre estas usinas.

O ácido maleico é relatado na literatura como presente nos colmos e nas pontas da cana-de-açúcar, porém em baixas concentrações quando comparados com os ácidos aconítico, lático e oxálico (STUPIELLO, 2016).

Adicionalmente aos ácidos relatados, nas cinco amostras de vinhaça, foi identificado um pico com espectro UV e TR semelhante ao pico detectado na solução do padrão do ácido aconítico e que foi atribuído ao aconitato.

Durante as análises detectou-se também a presença de outros picos com espectro UV característico de ácidos orgânicos, mas que não coincidiram com os TR dos padrões analisados.

Os picos 1 e 2 de TR de 2,5 e 3,9 min, respectivamente, foi identificado em todas as vinhaças. Os picos 3 e 4 (TR = 8,7 e 12,3 min, respectivamente) foram identificados nas vinhaças das usinas E, C e A. O pico 5 (TR = 13,8 min) nas vinhaças da A e de C, e o pico 6 (TR = 8 min) apareceu apenas na vinhaça de C. O pico B (TR = 17 min,4) já relatado na solução do padrão de ácido tartárico, foi também encontrado nas vinhaças E e C.

Figura 9 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça A e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm

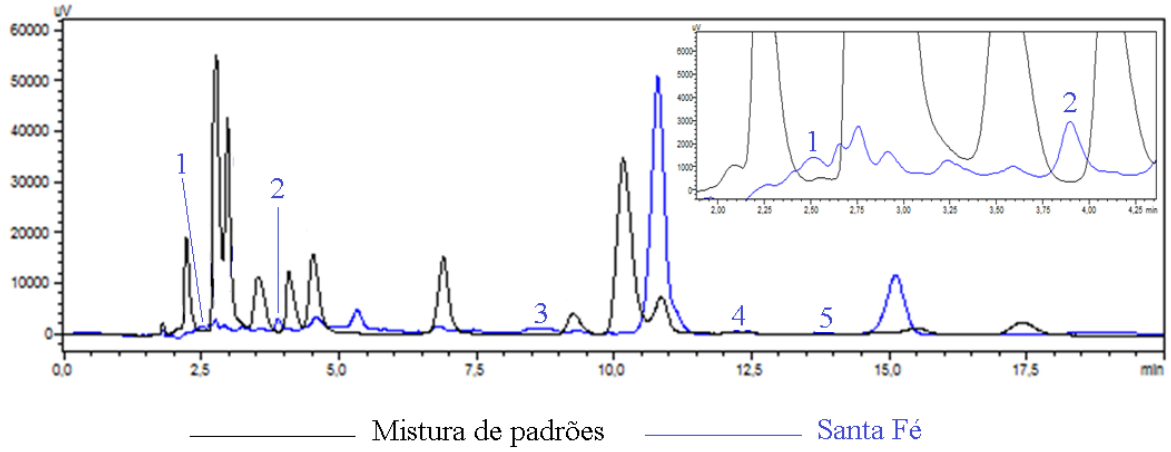


Figura 10 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça E e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm

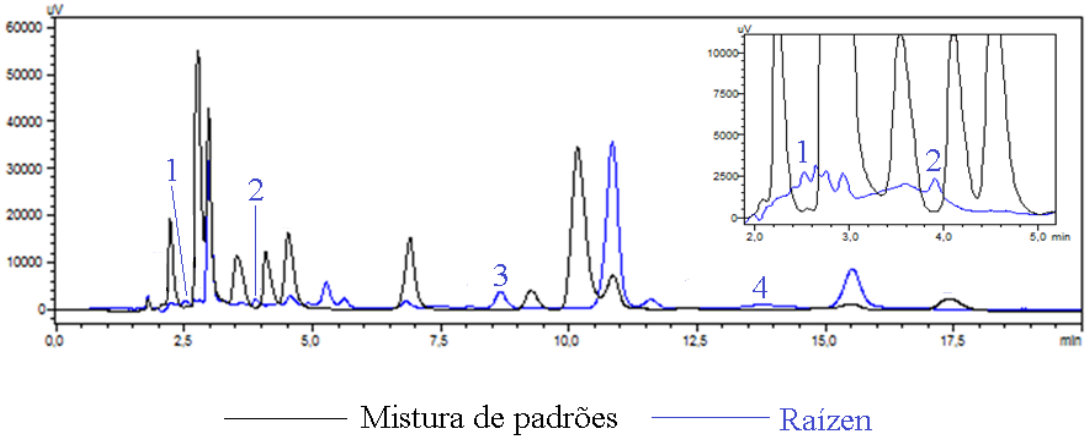


Figura 11 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça C e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm

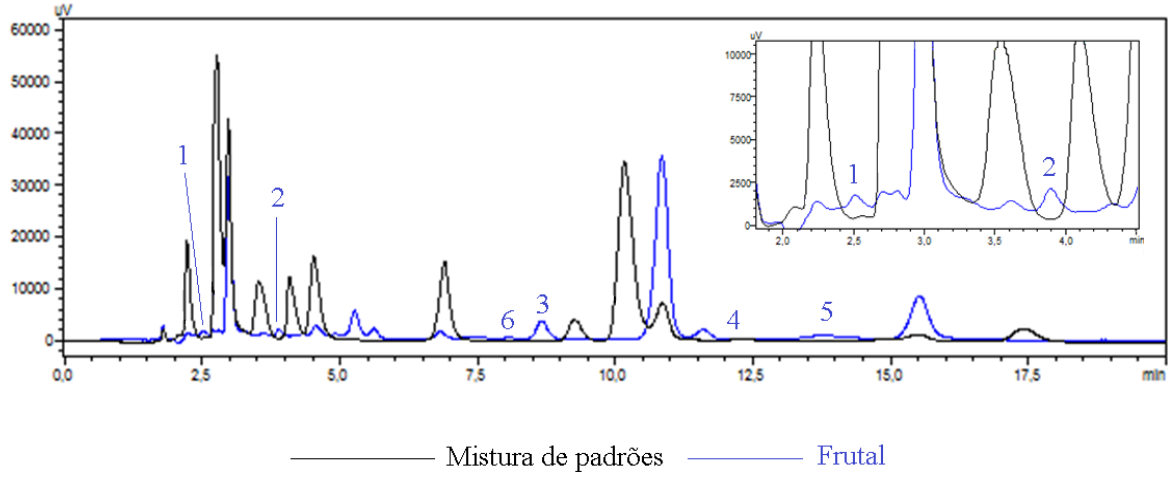


Figura 12 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça D e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm

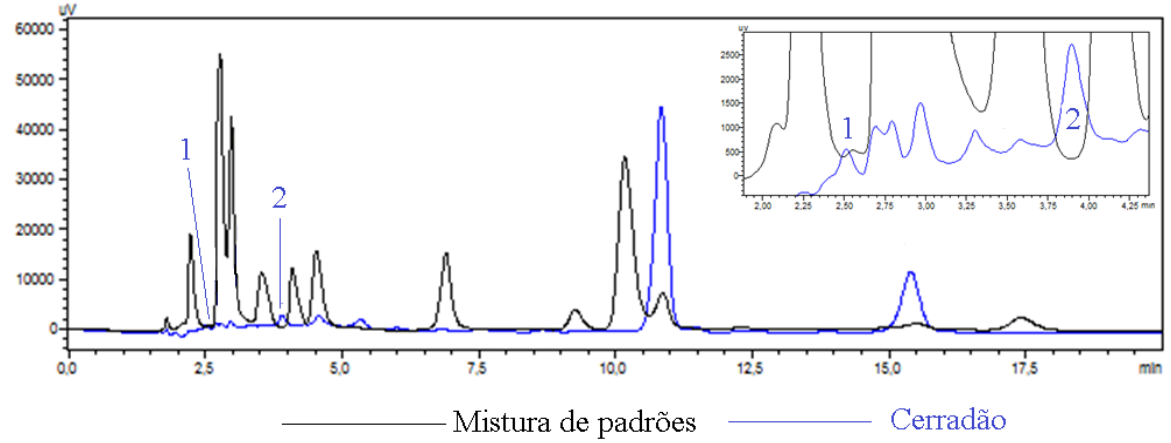
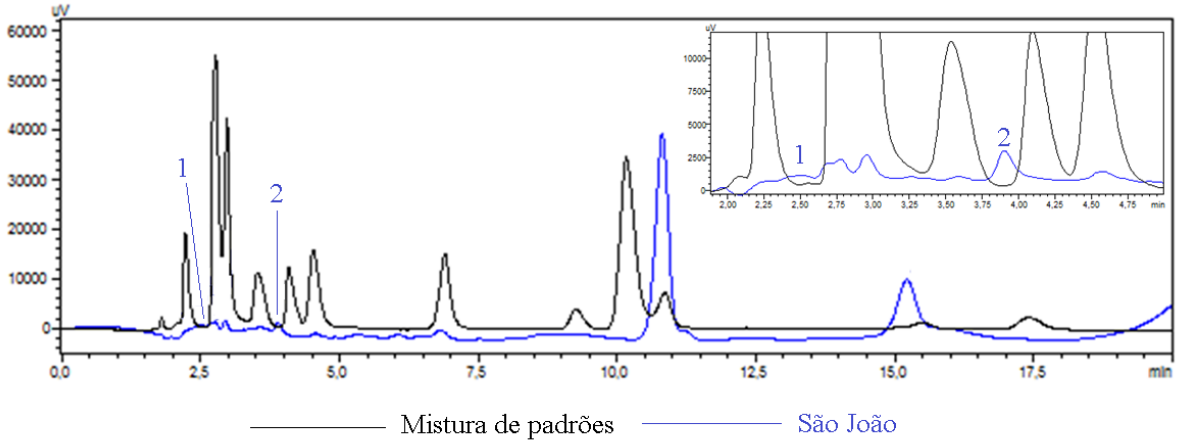


Figura 13 – Comparação do cromatograma CLAE-UV da vinhaça B e a Mistura dos ácidos orgânicos. Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm) em um método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3 mM $KH_2PO_4/(NH_4)_2SO_4$ (5:1 g/g) acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm



4.4. Análise Quantitativa dos Ácidos Orgânicos na Vinhaça

Após a identificação dos ácidos na vinhaça uma quantificação foi realizada visando estimar o teor dos mesmos em cada uma das amostras analisadas (Tabela 23).

Tabela 23 – Concentração dos ácidos orgânicos nas amostras de vinhaças

Ácidos Orgânicos	**C mg.L^{-1}**	**E mg.L^{-1}**	**D mg.L^{-1}**	**A mg.L^{-1}**	**B mg.L^{-1}**
Glutâmico	593,39	261,99	0,00	561,16	6311,20
Glicólico	5,83	3,49	31,69	18,93	260,72
Tartárico/Oxálico	2701,96	105,45	1379,16	503,31	6299,77
Málico	107,36	16,39	3423,07	1257,75	9136,15
Malônico	59,36	0,00	2660,75	0,00	0,00
Lático	19,54	0,00	175,48	99,96	334,44
Cítrico	404,18	247,41	0,00	1157,51	8437,75
Succínico	234,35	117,73	0,00	1002,21	0,00
Maleico	0 ,13	0,76	0,00	0,00	0,00
Aconítico	537,02	535,25	3381,59	1450,17	12555,41

De acordo com os dados apresentados na Tabela 23, o ácido com maior concentração em todas as vinhaças analisadas foi o ácido aconítico. Este resultado corrobora com as informações já reportadas na literatura de que este ácido é o majoritário na cana-de-açúcar

(THAI; DOHERTY, 2011; ASSIS JR et al., 2003; WALFORD, 1996; GUIVIRREZ; FERRARI, 1988; ROBERTS; MARTES, 1954; BLAKE; CLARKE; RICHARDS, 1987; MORALES et al., 2002). A sua concentração variou entre as amostras de vinhaça analisada, sendo que a vinhaça da usina B foi a que apresentou a maior concentração deste ácido (12555,41 mgL^{-1}), seguida das vinhaças das usinas D e A (3381,59 e 1450,17 mgL^{-1}, respectivamente). As vinhaças das usinas C e E apresentaram praticamente a mesma concentração (~536 mgL^{-1}). Nenhum estudo reportando a concentração deste ácido em amostras de vinhaça diluída foi encontrado na literatura. No entanto DOELSCH et al (2009) reporta o valor de 3116 mgL^{-1} deste ácido para vinhaça concentrada (7,4 % de umidade). Considerando o teor médio de água presente na vinhaça diluída (~ 95 % de água em sua composição) (ROLIM et al., 2013), a faixa de teor de ácido aconítico, obtido neste estudo (535,25-12555,41 mgL^{-1}), é superior aos valores reportados por DOELSCH et al (2009) para vinhaça concentrada.

Depois do ácido aconítico, os ácidos málico e cítrico têm sido relatados como os ácidos majoritário na cana-de-açúcar (THAI; DOHERTY, 2011; BLAKE; CLARKE; RICHARDS, 1987; ASSIS JR et al., 2003; WALFORD; 1996; GUTIERREZ; FERRARI, ORELLI, 1989; ROBERTS; MARTES, 1954; MORALES et al., 2002). No entanto, estudo de dosagem destes ácidos em caldo de cana apresentam níveis inferiores a 1 % de ácido cítrico (com estes níveis diminuindo com a maturidade da cana) e teores na faixa de 111,8-232,3 mgL^{-1} de ácido málico (GUTIERREZ; FERRARI, ORELLI, 1989). Em relação à vinhaça diluída, um teor máximo de 6168 mgL^{-1} de ácido málico é relatado (SANTOS et al., 2014), mas nenhum teor de ácido cítrico foi encontrado na literatura. Neste trabalho a maioria das vinhaças apresentaram concentrações do ácido málico abaixo da descrita por SANTOS et al (2014), com exceção da vinhaça da usina B que apresentou uma concentração de 9136,15 mgL^{-1}. Contudo, a concentração deste ácido na vinhaça da usina C está entre a faixa de teores descritos por GUTIERREZ; FERRARI; ORELLI (1989). A concentração do ácido cítrico da usina B foi a que apresentou maior teor com 8437,75 mgL^{-1}. Considerando o teor médio de água de 95 % relatado para vinhaças, a concentração representaria cerca de 657,25 mgL^{-1} do ácido cítrico na vinhaça concentrada (à 7,4 % de umidade). Este valor está condizente com a concentração relatada por DOELSCH et al (2009) que reporta para o ácido cítrico uma concentração de 878 mgL^{-1}.

Com relação ao ácido lático, exceto para a vinhaça proveniente da usina E, todas as outras apresentaram este composto numa composição consideravelmente variável. A vinhaça da usina C foi a que apresentou menor concentração (19,54 mgL^{-1}) enquanto que a da usina B foi a vinhaça com maior teor deste ácido (334,44 mgL^{-1}). A literatura tem reportado que este

ácido está em uma faixa de concentração de 250-670 mgL^{-1} nos caldos (ARAÚJO, 2017) e de 7700-12697 mgL^{-1} em vinhaças diluídas (DOWD et al., 1994; SANTOS et al., 2014). Os valores de concentração obtidas neste trabalho (19,54-334,44 mgL^{-1}) ficaram abaixo da concentração apresentada na literatura da vinhaça diluída. Uma vez que o ácido lático é formado pelas reações que ocorrem durante o tratamento do caldo, esta variação no teor do mesmo se deve provavelmente às diferenças no processo de produção do bioetanol em cada uma das usinas de onde as vinhaças foram provenientes.

A concentração exata dos ácidos tartárico e oxálico não pode ser determinada devido à coeluição dos picos já relatada nas sessões anteriores. No entanto a área total do pico que corresponde a este(s) ácido(s) geraram uma faixa de teor de 105,45 a 6299,77 mgL^{-1} nas amostras analisadas.

O teor de ácido oxálico na cana-de-açúcar é controverso na literatura, já sendo relatado como um dos principais componentes da cana-de-açúcar (WALFORD; 1996; ROBERTS; MARTES, 1954; THAI; DOHERTY, 2011; MORALES et al., 2002), assim como um dos ácidos que apresenta baixas concentrações na planta e seus derivados. (BLAKE; CLARKE; RICHARDS,1987). Estudo de dosagem deste ácido em caldo de cana mostra que níveis inferiores a 1 % estão presentes (GUTIERREZ; FERRARI, ORELLI, 1989). Para a vinhaça, estudo realizado por BENKE; MERMUT (1998) descreve a faixa de concentração de 15,8-72,3 mg/L^{-1} de ácido oxálico para a vinhaça diluída. Para a vinhaça concentrada (7,4 % de umidade) DOELSCH et al. (2009) relata o valor de 100 mg/L^{-1}, o que equivale a 7,8 mg/L^{-1} de ácido na vinhaça diluída (~ 95 % de água em sua composição).

O ácido tartárico foi relatado por WALFORD (1996) e MORALES et al (2002) como presente na cana, mas não como um dos compostos majoritários. Para a vinhaça diluída, não foram encontrados teores de referência na literatura, mas o valor de 133 mg/L^{-1} está descrito para a vinhaça concentrada o que equivale a 10,4 mg/L^{-1} de ácido na vinhaça diluída (DOELSCH et al., 2009).

O ácido succínico também apresenta dados controversos na literatura acerca do seu teor na cana-de-açúcar. BLAKE; CLARKE; RICHARDS (1987) relatam que este ácido está presente na cana-de-açúcar em baixas concentrações, enquanto ROBERTS; MARTES (1954) e THAI; DOHERTY (2011) descrevem que há concentrações significativas do mesmo na cana. GUTIERREZ; FERRARI; ORELLI (1989) descreve uma concentração de 4,9-13,3 de ácido succínico para o caldo da cana-de-açúcar de diferentes variedades e estágio de maturação. Para a vinhaça diluída os teores reportados na literatura encontram-se na faixa de 267,6 – 3624,0

mg/L^{-1} (SANTOS et al., 2014; BENKE; MERMUT, 1998). No presente trabalho o ácido succínico não foi detectado nas vinhaças das usinas D e B, mas nas demais vinhaças analisadas foi encontrado teores na faixa de 117,73 – 1002,21 mg/L^{-1}, corroborando com as concentrações descritas por SANTOS et al. (2014) e BENKE; MERMUT (1998).

Os ácidos malônico e maleico também têm sido descritos na literatura como presentes em baixa concentração na cana-de-açúcar (GUTIERREZ; FERRARI, ORELLI JR, 1989; MORALES et al., 2002). Para o ácido maleico, concentrações na faixa de 3,0-7,9 mgL^{-1} são reportados para o caldo da cana (GUTIERREZ; FERRARI, ORELLI, 1989). Neste trabalho estes ácidos foram menos frequentes, sendo encontrados em apenas em 2 vinhaças.

O ácido maleico foi detectado nas vinhaças proveniente das usinas de C e E, na concentração de 0,13 e 0,76 mgL^{-1}, respectivamente. Nenhum estudo foi encontrado na literatura reportando a sua concentração em vinhaça.

O ácido malônico também foi detectado na vinhaça da usina de C, na concentração de 59,36 mgL^{-1}. A outra vinhaça na qual foi detectado foi a da usina D na concentração de 2660,75 mgL^{-1}. A concentração encontrada na vinhaça da usina C corrobora com a faixa de concentração de 4,0-68,1 mgL^{-1}, reportada por BENKE; MERMUT (1998) em vinhaças diluídas.

Os ácidos glutâmico e glicólico também são relatados na cana-de-açúcar em baixas concentrações (WALFORD; 1996; MORALES et al., 2002). ARAÚJO (2017) descreve a faixa de concentração na ordem de traço até 150 mgL^{-1} de ácido glicólico no caldo de cana. Dados acerca do teor destes ácidos na vinhaça estão ausentes na literatura.

Nas vinhaças analisadas neste estudo, constatou-se a presença do ácido glicólico em todas as amostras analisadas, sendo a vinhaça da usina B a que possuiu a maior concentração (260,72 mgL^{-1}), contudo os teores desse ácido nas demais vinhaça foi na faixa de 3,99 –18,93, corroborando com a concentração descrita na literatura.

O ácido glutâmico também se demonstrou frequente entre as vinhaças analisadas, estando ausente apenas na vinhaça proveniente da usina D. A concentração deste ácido detectada nas amostras foi de 261,99 - 6311,20 mgL^{-1}.

Conforme os dados apresentados, observa-se que os teores de ácidos nas vinhaças analisadas apresentaram variações que, em alguns casos, são consideráveis e em outros não relevantes. Essa variação é esperada e justificada devido à formação dos ácidos, na planta e no processo industrial, estar relacionada à diversos fatores. Dentre estes fatores pode-se destacara composição do solo e o clima durante o plantio da cana-de-açúcar; a safra, sazonalidade e maturação da cana, durante o processo de colheita; a origem do mosto e o tipo de fermentação

empregados no processo produtivo da usina sucroalcooleira (NETO, 2016; DIAS et al., 2015; REECE, 2003; GOES; NETO, 2011).

4.5. Cinética de adsorção

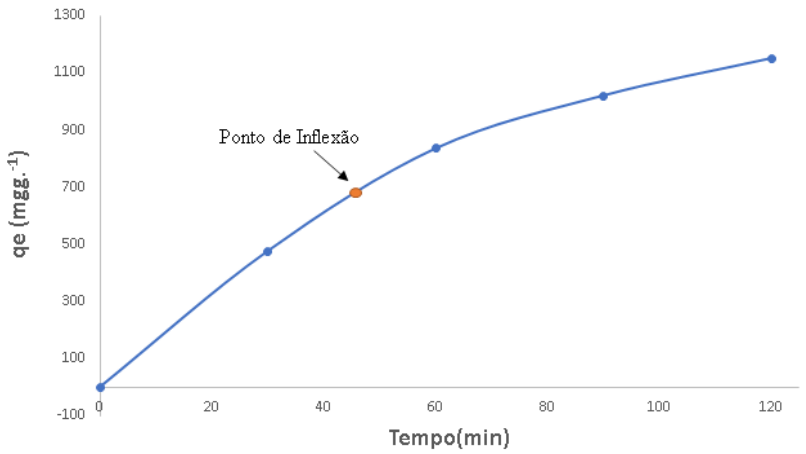
Os resultados obtidos pelo estudo de cinética mostraram que não ocorre adsorção dos ácidos maleico, glutâmico, malônico e glicólico pela resina PuroliteA400, nas condições definidas para este estudo (25 mL de solução de vinhaça, 0,2 g de resina, agitação à 200 rpm a temperatura ambiente e 2 horas de agitação). Para os demais ácidos, os gráficos de velocidade mostraram que a adsorção dos adsorvatos nos sítios ativos do adsorvente é beneficiada com o aumento no tempo de agitação. A medida que os sítios vão sendo ocupados, a monocamada saturada com moléculas de ácidos na superfície da resina geram uma força de repulsão nas moléculas dos ácidos que estão em solução levando o sistema a atingir o equilíbrio e a respectiva adsorção se tornar praticamente constante (SRIVASTAVA; MALL; MISHRA, 2005). Através do ponto de inflexão da curva de adsorção de cada um dos ácidos foi possível a determinação do tempo ideal de agitação (Tabela 24).

Tabela 24 – Tempo Ideal de cada ácido orgânico

Ácido Orgânico	**Tempo Ideal (min)**
Succínico	44
Málico	26
Lático	38
Cítrico	25
Oxálico/Tartárico	26
Aconítico	04

Na figura 14, é apresentado o gráfico de cinética de adsorção da resina PuroliteA400 pelo ácido succínico e seu respectivo ponto de inflexão, mostrando que o equilíbrio foi atingindo em 44 min.

Figura 14 – Curva cinética não-lineares na adsorção do ácido succínico na vinhaça com resina aniônica PuroliteA400



4.6 Isotermas de Adsorção

O processo de adsorção de um adsorbato num determinado adsorvente pode ser estudado e entendido através da construção de curvas de adsorção associadas a modelos teóricos (isotermas). Através das isotermas é possível saber se interação do adsorbato por determinado adsorvente ocorre e como o adsorvente efetivamente será adsorvido. Através destes modelos é possível obter também uma estimativa da quantidade máxima de adsorbato que o adsorvente adsorverá.

Neste trabalho os modelos de isoterma de Langmuir e Freundlich foram escolhidos para avaliar a capacidade da resina Purolite A400 em adsorver os ácidos da vinhaça estudados, pois são os modelos mais utilizados para descrever equilíbrios de adsorção, em especial em estudo com efluentes (OLIVEIRA; COELHO; MELO, 2018).

Os resultado obtidos pelos experimentos iniciais de determinação da concentração dos ácidos no equilíbrio (Ce) mostraram que a resina escolhia não possui capacidade de adsorção dos ácidos maleico, glutâmico, malônico e glicólico. Desta forma, o estudo com as isotermas foram avaliados para os ácidos aconítico, lático, tartárico/oxálico, cítrico, málico e succínico.

Conforme pode ser observado pelas curvas e pelos valores dos coeficientes de correlação obtidos (R^2) (Tabela 25, Figura 15) o modelo de Langmuir ajusta-se muito bem aos dados do estudo de adsorção obtidos para os ácidos lático e cítrico com valores acima de 0,9. Para os ácidos aconítico e oxálico/tartárico, apesar do modelo de Languimir não ter apresentado

valores de R^2 tão satisfatórios (0,8495 e 0,6138, respectivamente) foi o que melhor se adequou ao estudo dos ácidos dentre os dois avaliados.

O comportamento do ácido málico foi bem explicado pelo modelo de Freundlich (R^2=0,9447) (Tabela 25, Figura 16).

O ácido succínico foi o ácido que menos se aderiu aos modelos estudados (Tabela 25, Figura 17) e será discutido adiante pelo modelo de Languimir, por ter apresentando melhor valor de R^2 (0,34380) do que o modelo de Freundlich (R^2 =0,1162), mas o comportamento pode estar associado a desvios.

Figura 15 – Curvas das isotermas de Langmuir para os ácidos (a) lático; (b) cítrico; (c) aconítico; (d) oxálico/tartárico

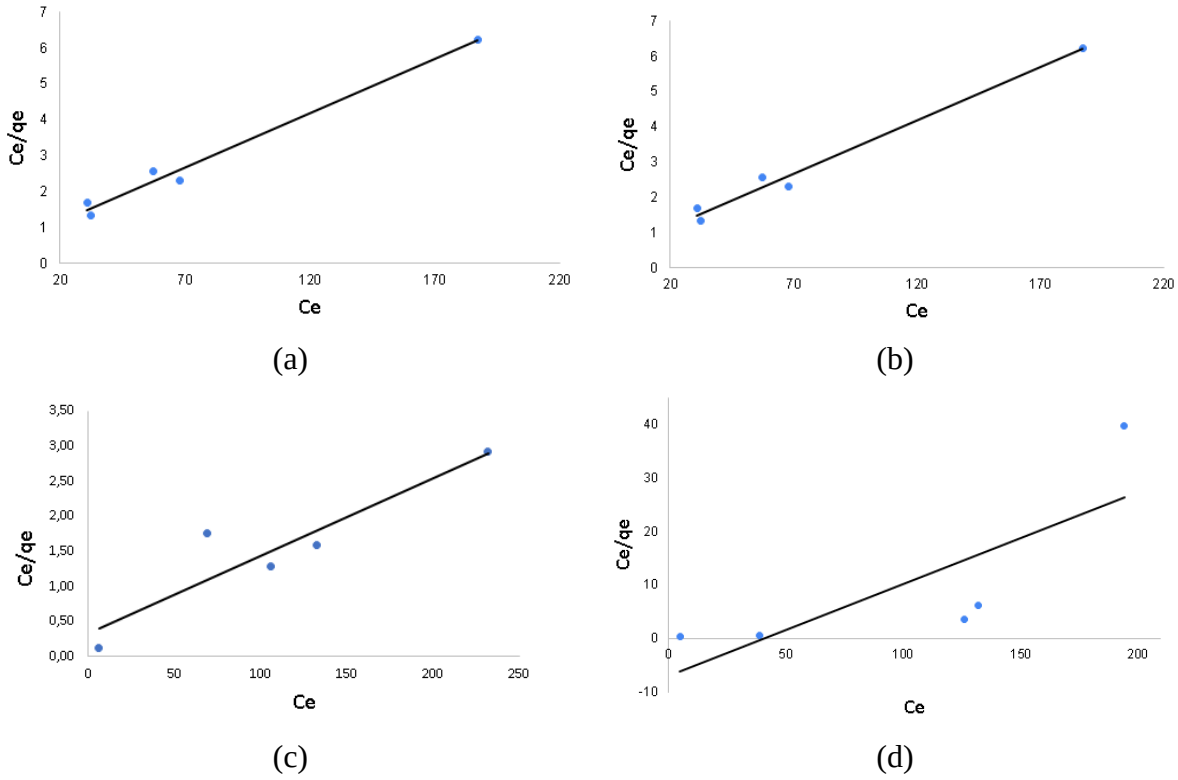


Figura 16 – Modelo de Freundlich para o ácido málico

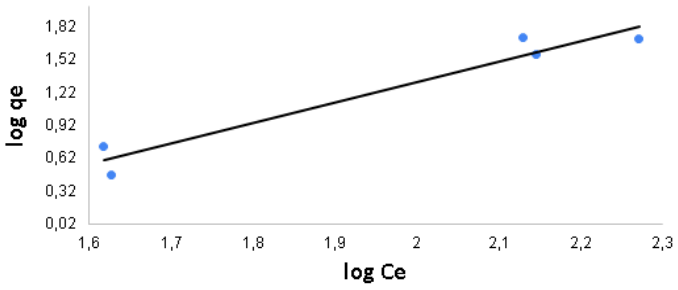


Figura 17 – Modelo de Langmuir para o ácido succínico

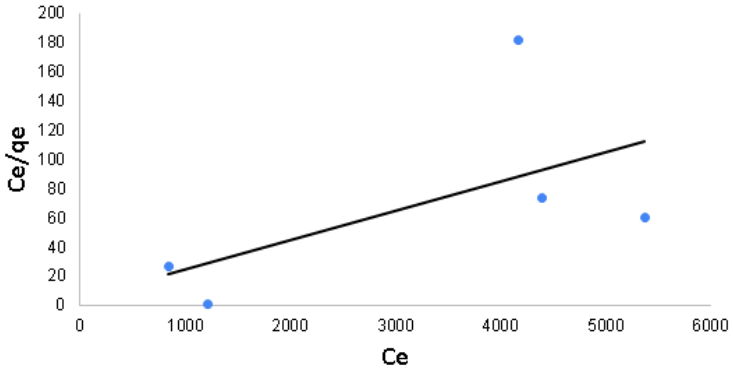


Tabela 25 – Parâmetros de Isotermas de Adsorções dos ácidos orgânicos na vinhaça

Ácido Orgânico	Constante de Langmuir				Constante de Freundlich			
	$q_{máx}$ (mgg^{-1})	$R_{lmédia}$	K_L	R^2	n	1/n	K_F (Lmg^{-1})	R^2
Aconítico	90,90	0,06	0,03	0,8495	6,13	0,16	31,93	0,4211
Málico	16,44	0,47	0,004	0,6546	0,54	1,85	243,44	0,9447
Succínico	50,00	0,06	0,004	0,3438	1,38	0,72	27829,15	0,1162
Lático	0,20	0,18	0,51	0,9983	3,94	0,25	1,80	0,6348
Cítrico	33,22	0,06	0,05	0,9836	4,63	0,21	10,17	0,5782
Oxálico/Tartárico	5,82	0,01	0,27	0,6138	6,27	0,15	40,84	0,0597

Analisando os resultados de $q_{máx}$ de cada um dos ácidos que foram explicados pelo modelo de Langmuir, constata-se que o ácido aconítico é o que apresentou melhor capacidade de adsorção pela resina, com uma concentração máxima de 90,90 mgg^{-1}, seguido pelo ácido cítrico (concentração máxima de 33,22 mgg^{-1}). Os ácidos oxálico/tartárico e lático, apesar de

presentarem interação com a resina, possuem uma menor capacidade de adsorção, com concentrações máximas de 5,82 e 0,20 mgg^{-1}, respectivamente.

Em relação aos demais ácidos estudados, o ácido succinico, demonstrou com uma adsorção satisfatória com a resina ($q_{máx}$ = 50,00 mgg^{-1}), no entanto, não foi bem descrito pelo modelo de Languimir e, portanto, este resultado não pode ser considerado com confiabilidade.

O ácido málico foi melhor descrito pelo modelo de Freundlich e o valor de K_F mostra que a sua capacidade de adsorção na resina é de 243,44 Lmg^{-1}.

Os valores de R_L no modelo de Languimir é indicador da intensidade de adsorção entre adsorvato e adsorvente. Valores de $0 < R_L < 1$ indica que o processo de adsorção é favorável enquanto $R_L > 1$ demonstram incompatibilidade entre que adsorvato e adsorvente. Dos 5 ácidos que foram avaliados pelo modelo de Languimir, todos apresentaram valores de R_L no intervalo $0 < R_L < 1$ indicando a compatibilidade da resina com estes ácidos.

No modelo de Frendlich, esta intensidade de adsorção é demonstrada pela variável n, onde $1 < n < 10$ expressa uma reação é favorável (principalmente se o n estiver mais próximo do 10) e $n < 1$ a reação é desfavorável. No caso do ácido málico que foi descrito por este modelo o valor de n=0,54 indicando que a adsorção deste ácido também é favorável com a resina Purolite A400.

Os dados obtidos nos experimentos de adsorção, além de analisado pelos modelos de Languimir e Frendlich, também foram processados em função da concentração dos mesmos antes e depois da agitação no tempo ideal. De acordo com este tratamento dos dados, dependendo da concentração inicial do ácido em solução, a capacidade de adsorção do ácido lático pelo adsorvente foi de 56 - 85 %, do ácido aconítico foi de 73 - 96 %, do ácido cítrico foi de 56 – 85 %, dos ácidos oxálico e tartárico foi de 16 – 96 %, do ácido succínico foi de 4 – 93 % e do ácido málico foi de 35 – 75 %.

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que os métodos de análises por CLAE-UV e LC-MS desenvolvidos foram eficientes para a detecção, identificação e quantificação dos ácidos orgânicos em vinhaça.

A metodologia desenvolvida priorizou atender os princípios da química verde de minimização no uso de solventes e geração de resíduos tóxicos, empregando uma fase móvel isenta de solvente orgânico e um baixo fluxo de eluição.

Através da comparação do perfil UV, e do tempo de retenção dos padrões analíticos de alguns ácidos relatados para a cana-de-açúcar com os compostos encontrados nas amostras de vinhaça submetida ao processo de pré-tratamento com SFE, foi possível a identificação de 11 ácidos, sendo o aconítico, málico e glicólico mais frequentes. A faixa de concentração dos teores dos ácidos variando entre 0,13 – 12555,41 mgL^{-1}.

Análises qualitativas e quantitativas dos ácidos nas amostras de vinhaça de diferentes procedências demostrou que, em geral, as vinhaças contêm os mesmos tipos de ácidos com variação considerável apenas em relação aos seus teores em cada amostras. Estas variações são justificadas pelo fato dos ácidos orgânicos serem metabólitos secundários e a presença dos mesmos na vinhaça estar relacionada com o teor dos mesmos no caldo, que por sua vez dependem de diversos fatores da plantação, colheita e processo produtivo.

A validação do método para a análise dos ácidos nas amostras de vinhaça demonstrou que o método é exato e preciso e que apresenta linearidade na faixa de concentração estudada. O teste de seletividade comprovou que o método é seleto para os ácidos estudados, com exceção do oxálico e tartárico que apresentaram coeluição.

As isotermas demonstraram que a adsorção dos ácidos com a resina Purolite A400, exceto para os ácidos maleico, malônico, glicólico e glutâmico. A capacidade máxima de adsorção da resina pelos ácidos aconítico, succínico, lático, cítrico e oxálico/tartárico foram 90,90; 50; 0,2; 33,22; 5,82 mgg^{-1}, respectivamente. A capacidade máxima de adsorção da resina pelo ácido málico foi 243,44 Lmg^{-1}. Os experimentos de adsorção realizado mostrou que a porcentagem de extração dos ácidos da vinhaça da usina D pela resina Purolite A400 foi na faixa de 4 - 96 %.

O estudo desenvolvido mostra que vinhaça apresentam ácidos que possuem aplicações industriais em teores demonstram o potencial deste efluente em ser empregado como fonte alternativa para obtenção de ácidos orgânicos, auxiliando na demanda por estes compostos pelos setores industriais e também contribuindo para a minimização do seu teor de matéria orgânica e acidez promovendo um melhor aproveitamento na fertirrigação.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, A. O; OLIVEIRA, A. M. D; MOURA, T. E; SOUZA, K. S. M.G; CLERICUZI, G. Z. Utilização da argila bentonita como adsorvente para remoção do óleo de água produzida sintética. **XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química,** 2017.

ALMEIDA, M. Vinhaça – principais técnicas de aplicação. Disponível em: <https://piracicabaengenharia.com.br/vinhaca-principais-tecnicas-de-utilizacao/> Acessado em 27 de março de 2019.

Aplicações industriais do ácido cítrico. **Aditivos & Ingredientes**, v123, p.54 – 62, 2015. Disponível em <https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201605/2016050145806001463580872.pdf> Acessado em 04 de março de 2020.

AMIN, N. K. Removal of reactive dye from aqueous solutions by adsorption onto activated carbons prepared from sugarcane bagasse pith. **Desalination,** v. 223, p. 152–161, 2008.

ARAÚJO, E. G. **Aplicabilidade da voltametria de pulso diferencial para a quantificação de ácido fólico e ácido oxálico**: um método Comparativo. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2013.

ARAÚJO, F. A. D. **Intensificação do processo de purificação do caldo da cana-de-açúcar por decantação química e adsorção.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia da Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2017.

ASSIS JR, C. A; SHIMIZU, T; KHAN, M. K; AKAO, S. Organic acid and sugar contentes in sugarcane stem apoplast solution and their role as carbono source for endophytic diazotrohs. **Soil Science and plant nutrition,** v.49, p.915-920, 2003.

BABAEI, M; TSAPEKOS, P; MORALES, M. A; HOSSEINI, M; EBRAHIMI, S; NIAEI, A; ANGELIDAKI, I. Valorization of organic waste with simultaneous biogás upgrading for the pro duction of succinic acid. **Biochemical engineering jornal,** v147, p.136 – 145, 2019.

BALDACIN, A. C. S; PINTO, G. M. F. Biodigestão anaeróbica da vinhaça: aproveitamento energético do biogás. **FACP,** v.7, 2015.

BANDOSZ, T. J; ANIA, C. O. Chapter 4 – Surface chemistry of activated carbons and its characterization. In: Interface Science and Technology. [s.l.] **Elsevier**, p. 159–229, 2006.

BANERJEE, S; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte**. International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012,1- 40, 2012.

BARCELLOS, T. S. **Eletro-oxidação do ácido maleico, utilizando diferentes composições de ânodos dimensionalmente estáveis**. Dissertação (Mestre em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

BENKE, M. B; MERMUT, A. R. Liquid sugarcane residue: characteristics and interaction with soil constituints. **Agriculture and Agri-food Canada,** 1998.

BERMANN, C. Crise ambiental e as energias renováveis. **Ciência e Cultura**, v60, n3, 2008.

BERNARDES, A. N; GODOI, L. A. G; CAMILOTI, P. R; GOMES, A. C; SANCHEZ, B. L S; TORRES, A. P. R; BOTTA, L. S. Organic acids and alcohols quantification by HPLC/RID

in sugarcane vinasse: analytical method validations and matrix effect assessment. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry,** p.2 - 12, 2019.

BLAKE, J. D; CLARKE, M. L; RICHARDS, G. N. Determination of organic acids in sugar cane process juice by high-perfomace liquid chromatography: improved resolution using dual aminex HPX-87H cátion Exchange collumns equilibrated to diferente temperatures. **Journal of chromatography,** v. 398, p.265-277, 1987.

BRASIL. **Decreto-Lei nº 303**, de 23 de fevereiro de 1967. Cria o conselho nacional de controle da poluição ambiental e dá outras providências. Disponível em < http://legis.senado.leg.br/norma/523244/publicacao/15708158 > Acessado em 1 de abril de 2020.

BRASIL. **Portaria/GM n.º 158**, de 3 de novembro de 1980. Proibi o lançamento, direto ou indireto, do vinhoto em qualquer coleção hídrica, pelas destilarias de álcool instaladas ou que venham a se instalar no País, deixando de prever, contudo, a poluição causada pelas destilarias de bebidas alcólicas. Disponível em: <http://faolex.fao.org/docs/pdf/bra14334.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2020.

BRASIL. **Portaria/GM n.º 323**, de 29 de novembro de 1978. Considera os danosos efeitos da vinhaça. Disponível em: <http://faolex.fao.org/docs/pdf/bra14330.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2020.

BRASIL. **Projeto de lei n.º 5182**, de 20 de março de 2013. Dispõe sobre o armazenamento, transporte e aplicação no solo da vinhaça gerada pela atividade sucroalcooleira no processamento de cana-de-açúcar. Disponível em: < https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=568376 >. Acesso em: 4 abr. 2020.

BYLUND, D; NORSTRÖM, S. H; ESSÉN, S. A; LUNDSTRÖM, U. S. Analysis of low molecular mass organic acid in natural Waters by íon exclusion chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A,** v.1176, p.89-93, 2007.

CAMPOS, L. J. M; PRATES, H. T; PITTA, G, V, E; QUEIROZ, C. G. S; SCHAFFERT, R, E; ALVES, V. M. Determinação de ácidos orgânicos em exsudatos de raízes de milho pela técnica de HPLC. **XXIV Congresso nacional de milho e sogro,** Florianópolis, SC, 2002.

CANDIDO, C. **Fisiologia de microalgas em vinhaça tratada e a temática de resíduos na educação ambiental.** Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de ciências biológicas e da saúde da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2019.

CASTRO, L. S. **Síntese e caracterização de copolímeros de ureia e ácido succínico.** Dissertação (Mestre em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia Ambiental da Universidade de Federal da Bahia. Salvador, 2014.

CASTRO, S. B; ANDRADE, S. A. C. **Tecnologia Do Açúcar.** Recife, PE. Editora Universitária UFPE, 2007.

CFR - Code of Federal Regulations Title 21. **FDA.** Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1091>. Acessado em 25 de outubro de 2021.

CHEMAT, F; VIAN, M. A; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular sciences,** v13, p.8615 – 8627, 2012.

CHEN, Y; NIELSEN, J. Biobased organic acid production by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology,** v.37, p.165-172, 2016.

CMS – Científica do Brasil. **Análise por HPLC ou UHPLC, como escolher a melhor coluna.** Disponível em: <https://cmscientifica.com.br/analises-por-hplc-ou-uhplc-como-escolher-a-melhor-coluna/>. Acessado em 10 de dezembro de 2021.

COELHO, C. C. G. M. **Utilização digestiva de dietas semi simplificadas com fenos enriquecidos com vinhaça para coelhos em crescimento.** Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

COLLINS, C; BRAGA, G. L; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas, SP. Editora da UNICAMP, 2009.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **P.4 231**: Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola: norma técnica. São Paulo: CETESB, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Cana-de-açúcar:** acompanhamento da safra brasileira. Brasília: CONAB, 2021.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Vinhaça –** Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. Brasília: CONAB, 2015.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL - COPAM. **Deliberação Normativa nº 164**, 12 de abril de 2011. Estabelece normas complementares para usinas de açúcar e destilarias de álcool, referentes ao armazenamento e aplicação de vinhaça e águas residuárias no solo agrícola. Disponível em <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=16794> Acessado em 04 de abril de 2020.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL - COPAM. **Deliberação Normativa nº 184**, 14 de junho de 2013. Disciplina o armazenamento e a aplicação em solo agrícola de vinhaça e águas residuárias provenientes da fabricação de aguardente, cachaça, destilado alcoólico simples e de outros produtos obtidos por destilação a partir da cana-de-açúcar, destinados a adição em bebidas. Disponível em < http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=27535 > Acessado em 04 de abril de 2020.

CORAZZA, R. I.; FILHO, S. S. Opções produtivas mais limpas: uma perspectiva evolucionista a partir de um estudo de trajetória tecnológica na agroindústria canavieira. *In*: XXI Simpósio

de Gestão da Inovação da Tecnológica, 2000, Núcleo PGT – USP. São Paulo. **Anais.** São Paulo: XXI Simpósio de Gestão da Inovação da Tecnológica, p.89-102, 2000.

CORRÊA, A. P. R; TEIXEIRA, V. H; LOPES, S. P; OLIVEIRA, M. S. Avaliação das propriedades físicas e mecânicas do adobe (tijolo de terra crua). **Ciência e Agrotecnologia,** v.30, 2005.

CRUZ, L. F. L. S; DUARTE, C. G; MALHEIROS, T. F; PIRES, E. C. Análise da viabilidade técnica, econômica e ambiental das atuais formas de aproveitamento da vinhaça: fertirrigação, concentração e biodigestão. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais,** v.29, 2013.

DIAS, M. O. S; FILHO, R. M; MANTELATTO, P. E; CAVALETT, O; ROSSELL, C. E. V; BONOMI, A; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.

DOELSCH, E; MASION, A; CAZEVIEILLE, P; CONDOM, N. Spectroscopic characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. **Waste Management,** v.29, p.929-1935, 2009.

DOWD, M. K; LOHANSEN, S. L; CANTARELLA, L; RAILLY, P. J. Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. **J. Agric. Food Chem.,** v.42, p.283 – 288, 1994.

DRUMOND, A. A. L; BARBOSA, K. F; FRANÇA, J. B. A. O uso da vinhaça na fertirrigação da cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L). **7ª jornada acadêmica,** v7, n1, 2013.

ELAIUY, M. L. C. **Biodigestão anaeróbicada vinhaça de cana-de-açúcar:** abordagemdo modelo ADM1 e eficiências de biodegradação no solo. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Faculdade de engenharia civil, arquitetura e urbanismo da Universidade de Campinas. Campinas, 2016.

ELGSTOEN, K. B. P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine measurement of oxalic acid in human plasma. **Journal of chromatography B,** v.873, p.31-36, 2008.

FALONE, S. Z; VIEIRA, E. M. Adsorção/dessorçãodo explosivo tetril em turfa e em argilossolo Vermelho amarelo. **Quimica nova,** 27, p.849-854, 2004.

FASCIANO, J. M; MANSOUR, F. R; DANIELSON, N. D. Ion-Exclusion HighEficiência Liquid Chromatography of Aliphatic Organic Acids Using a SurfactantModified C18 Column. **Journal of chromatographic science,** v. 54, p. 958-970, 2016.

FAVERO, D. M. **Clarificação do caldo de cana-de-açúcar pelo processo de carbonatação.** Disseração (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

FERNANDES, B. S; VIEIRA, J. P. F; CONTESINI, F. J; MANTELATTO, P. E; ZAIAT, M; PRADELLA, J. G. C. High value added lipids produced by microorganisms: a potential uso of sugarcane vinasse. **Critical reviewsin biotechnologhy,** v.1, 2017.

FERREIRA, L. F. R; AGUIAR, M. M; MESSIAS, T. G; POMPEU, G. B; LOPEZ, L. M. Q; SILVA, D. P; MONTEIRO, R. T. Evaluation of sugar-cane vinasse treat with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v74, p. 132–137, 2011.

FERREIRA, V. F; ROCHA, D. R; SILVA, F. C. Química verde, economia sustentável e qualidade de vida. **Revista virtual de química,** v.6, p. 85 – 111, 2014.

FILHO, F. E. F; ARAÚJO, G. J. F. Normativos federais e estaduais reguladores da destinação da vinhaça no Brasil: uma proposta de nova abordagem. **Revista de administração, contabilidade e economia da FUNDACE,** v. 7, p.146 – 160, 2016.

FILHO, J. O; LEME, E. J. A. Utilização agrícola dos resíduos da agroindústria canavieira. **Simpósio sobre Fertilizantes na Agricultura Brasileira**, 1984.

FLORES, P; HELLÍN, P. FENOLL, J. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. **Food chemistry,** v.132, p.1049-1054, 2012.

FOGAÇA, F. M; MORAES, L. C. K; OLIVEIRA, G. A; NAKAGAKI, J. M. Cultivo de microalgas em meio alternativo enriquecido com vinhaça para indicativo de potencialidade na produção de biocombustíveis. **XIV Fórum latino Americano de Engenharia e Sustentabilidade**, 2016.

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

GIGANTE, A. C, PEZZA, L, PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de ácido glicólico com ácido cromotrópico assistida por forno de mircoondas. **Ecletica Química**, v 27, 2002.

GOES, A. P; NETO, L. **Vinhaça:** produção e destinação via fertilizante na formula diluída ou concentrada. Monografia (Especialista em Engenharia Sanitária ou Tecnologia Ambiental) – Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

GOMES, M. T. M. S; EÇA, K. S; VIOTTO, L. A. Concentração da vinhaça por microfiltração seguida da nanofiltração com membranas. **Pesquisa agropecuária brasileira,** v.46, p.633 – 638, 2011.

GORREN, R. C. R. **Biocombustíveis – Aspectos sociais e econômicos:** comparação entre Brasil, Estados Unidos e Alemanha. Dissertação (Mestre em Energia) – Instituto de Eletrotécnica e Energia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

GRANATO, E. F; SILVA, C. L. Geração de energia elétrica a partir do resíduo da vinhaça. **Enc. Energ. Meio Rural,** v.4, 2002.

GRANT, K. E; LUCKE, R. B; CLAUSS, S. A; MONG, G. M; LERNER, B. D; CAMPBELL, J. A. Qualitative determination of low-molecular-weight organic acids mixed hazardous wastes using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemestry,** v. 207, p.247-261, 1996.

GUARIEIRO, M. S. **Utilização da vinhaça no cultivo da microalga *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva visando à produção de biomassa aplicada ao mercado do biodiesel.** Dissertação (Mestre em Biologia Vegetal) – Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2019

GUILHERME, A. A; PINTO, G. A. S; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido lático por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.29, p.738-74, 2009.

GUTIERREZ, L. E; FERRARI, S. E; ORLLI JR, A. A. Ácidos orgânicos de folhas de três variedades de cana-de-açúcar (Saccharun spp) em quatro estádios de maturidade. **An. Esalq,** v.45, p.441-452, 1989.

HASSAN, S. E; RAHMAN, M. A. A; ROUSHDY, M. M; AZAB, M. S; GABER, M. A. Effective biorefinery approach for latic acid production based on co-fermentation of mixed organic acid waste by *Enterococcus durans* BP130. **Biocatalysis and agricultural biotechnology,** v.20, 2019.

HENRIQUES, B. G; SOUSA, V. P; VOLPATO, N. M; GARCIA, S. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação do teor do ácido glicólico na matéria prima e em formulações dermocosméticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v.43, p.39-45, 2007.

HONIG, P. Principles of sugar technology. Amsterdam: **Elsevier Pub**, 1963.

HUANG, Y.; TIAN Y., ZHANG Z., PENG C. A HILIC–MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar. **Journal of Chromatography B**, v. 905, p. 37-42, 2012.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION- ICH. (2005). Harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (pp. 13). Geneva: ICH.

IVANOVA-PETRPULOS, V.; PETRUSEVA, D.; MITREV, S. Rapid and simple method for determination of target organic acids in wine using UHPL-DAD analysis. **Food Analytical Methods,** v.12, p. 1078-1087, 2020.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica,** v.2, p.12-25, 2010.

JENSEN, W. B. The origino of the names malic, maleic, and malonic acid. **J. Chem. Educ.,** v.84, p.924, 2007.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and soil,** v.205, p.25 – 44, 1998.

KANITKAR, A; AITA, G; MADSEN, L. The recovery of polimerization grade aconitic acid from sugarcane molasses. **Chemical Technology and Biotechnology,** v.88, p.2188-2192, 2013.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodisel no Brasil. **Revista Estudos Avançados**, v.24, p 226, 2010.

KREMER, T. O. Resinas de troca iônica. Kurita. Disponível em: https://kurita.com.br/index.php/artigos-tecnicos/resinas-de-troca-ionica/ Acessado em 12/01/2022

LAIME, E. M. O; FERNANDES, P. D; OLIVEIRA, D. C. de S; FREIRE, E. de A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.5, 2011.

LANÇAS, F.M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente ``compatíveis``?. **Scientia Chromatographica**, v.1, p.35-61, 2009.

LATIF, Z; SARKER, S. D. Isolation of natural products by preparative high-performance liquid chromatography (Prep-HPLC). In: SAKER, S.D.; NAHAR, L. **Natural Products Isolation: Methods in Molecular Biology (Methods and protocols)**, 3ª Ed, v. 865. New York: Human Press. Springer Protocols, 225 -274, 2012.

LEANDRO-SILVA, E.; PIPI, A. R. F.; MAGDALENA, A. G.; PIACENTI-SILVA, M. Aplicação dos modelos de Langmuir e Frendlich no estudo da casca de banana como bioadsorvente de cobre (III) em meio aquoso. **Matéria**, v.25, 2020.

LEDER, P. J. S.; PORCU, O. M. The Importance of UV-Vis Spectroscopy: Application in Food Products Characterization. **Scholarly Journal of Food and Nutrition.** v. 1, 59- 62, 2018.

LENARDÃO, E. J; FREITA G, R. A; DABDOUB M. J; BATISTA A. C. F; SILVEIRA C. da C. “Green Chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v.26, 2003.

LIU, Z; ROCHFORT, S. A fast liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for quantification of major polar metabolites in plants. **Journal of chromatography B,** v.912, p.8-15,2013.

MACHADO, L. S. C; COELHO, W. L. V; SILVA, F. S; PORTO, A. G; SANTOS, P. Análise do potencial de geração de energia através da utilização da vinhaça no estado do Mato Grosso. **IV Encontro de Engenharia de Produção Agroindustriais,** 2010.

MAJZOOBI, M.; BEPARVA, P. Effects of acetic acid and lactic acid on physicochemical characteristics of native and cross-linked wheat starches, **Food Chemistry,** v.147, p.312–317, 2014.

MALDANER, L; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quimica Nova,** v.32, p. 214 – 222, 2009.

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino do petróleo.** Dissertação (Mestre em Ciências do Planejamento Energético) – Faculdade de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

MCCABE, W. L; SMITH, J. C; HARRIOT, P, "Unit Operations of Chemical Enginnering", **McGraw-Hill International Ed**., 6ed., 2001.

MENDES, A. C. D. **Avaliação do teor de ácido glutâmico em variedades de tomate indústria, no Vale do Tejo.** Dissertação (Mestre em Produção de Plantas Aromáticas e Medicinais) – Escola Superior Agrária de Santarém do Instituto Politécnico de Santarém. Santarém, 2014.

MENDES, A. P. A; TEIXEIRA, C. A. N; ROCIO, M. A. R; D'OLIVEIRA, L. A. S. Panoramas Setoriais 2030 – petróleo e gás. In: **Panoramas setoriais 2030:** desafios e oportunidades para o Brasil. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Sem volume, p.93 -105, 2017.

MENEZES, C. C. N; SANTOS, S. M; BORTOLI, R. Mapeamento de tecnologias ambientais: um estudo sobre patentes verdes no Brasil. **Gestão Ambiental&Sustentabilidade,** v.5, 2016.

MILTENBERGER, K. Hydroxycarboxylic acids, aliphatic. New York: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemestry,** 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Manual de métodos de análises de bebidas e vinagres.** Brasília, 2019. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/bebidas-e-vinagres-metodos-da-area-bev-iqa-1> Acessado em 06 de fevereiro de 2020.

MORALES, A. A.; VICTORIA, H. M.; GODSHALL, M. A.; JARAMILLO, A. A.; LARRAHONDO A., JESUS, E.; GRIMM, C. Identification of organic compounds in vinasse. Procedings of the Sugar. **Processing Research Conference**, 2002.

MORTATTI, B. C. **Caracterização físico-quimica dos solos e comportamento dos contaminantes da vinhaça por processo de difusão.** Dissertação (Monografia) – Universidade Estadual de Campinas, 2010.

NASCIMENTO, R. F; LIMA, A. C. A; VIDAL, C. B; MELO, D. Q; RAULINO, G. S. C. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. Fortaleza (CE): **Imprensa Universitária.** 2014.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem compound database. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Acessado em 02 de outubro de 2021.

NELSON, E. K. Some organic acids of sugar cane molasses. **Food research Division, bureau of chemistry and soils**, United States department of agriculture, v.51, 1929.

NETO, A. E. Estado da arte da vinhaça. Piracicaba (SP): **União da Indústria de Cana-de-Açúcar.** 2016.

NETO, A. E; NAKAHODO, T. Caracterização Físico-Química da Vinhaça, CTC, **Relatório Interno**, 1995.

OLIVEIRA, F. M; COELHO, L. M; MELO, E. I. Avaliação de processo adsortivo utilizando mesocarpo de coco verde para remoção do corante azul de metileno. **Revista Matéria,** v. 23, 2018.

OLIVEIRA, M. Vinhaça alternative. **Revista Pesquisa Fapesp,** v.186, 2011.

PARANÁ (ESTADO). **Decreto 10068**, 06 de fevereiro de 2014. Disponível em: < https://www.legislacao.pr.gov.br/legislacao/pesquisarAto.do?action=exibir&codAto=113500&indice=1&totalRegistros=1&dt=4.6.2020.18.37.59.840>. Acessado em 04 de abril de 2020.

PARNAUDEAU, V; CONDOM, N; OLIVER, R; CAZVIEILLE, P; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration process. **Bioresource Technology,** v.99, 1553–1562, 2008.

PAULA, J. N. **Biocombustíveis**: uma realidade. Dissertação (Mestre em Formas Alternativas de Energia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.

PEREIRA, E. M. O ouro negro: petróleo e suas crises políticas, econômicas, sociais e ambientais na 2ª metade do século XX. **Dossiê religião e reliogiosidade**, v.5, 2008.

PEREIRA, T. J. **Estudo da utilização de vinhaça no preparo da cuba e na fermentação alcóolica.** Dissertação (Mestre em Tecnologia Ambiental) – Centro de ciências exatas, naturais e tecnológicas da Universidade de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2009.

PINHEIRO, M. H. T; LEMOS, V. P; DANTAS, K. G. F; VALENTIM, T. L. Especiação e quimissorção de Pb(II) em rejeito de caulim. **Quim. Nova,** v.36, p. 272 – 278, 2013.

PIRES, R. A. P; FERREIRA, O. M. **Utilização da vinhaça na bio-fertirrigação da cultura da cana-de-açúcar**: Estudo de Caso em Goiás. Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Católica de Goiás. Goiania, 2008.

PLOTKA, K; TOBISZEWSKI, M; SULEJ, A. M; KUPSKA, M; GÓRECKI, T; NAMIESNIK, J. Green chromatography. **Journal of chromatography A,** v.1307, p.1 – 20, 2013.

POLLAK, P; ROMEDER, G. Malonic acids and derivatives. **Van Nostrand's Encyclopedia of Chemestry,** 2005.

POVEDA, M. M. R. **Análise econômica e ambiental do processamento da vinhaça com aproveitamento energético.** Dissertação (Mestre em Ciências) – Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

PRADA, S. M; GUEKEZIAN, M; SUÁRES-IHA, M. E. V. Metodologia analítica para a determinação do sulfato em vinhoto. **Química Nova,** São Paulo, v.21, 1998.

PRATA, P. S; MOGOLLON, N. G. S; AUGUSTO, F. Técnicas cromatográficas multidimensionais na investigação de metabólitos secundários. **Scientia Chromatographica.** v.8, p. 209-229, 2016.

PUROLITE. PuroliteA400. Disponível em: https://www.purolite.com/product/pt/a400 Acessada em 13 de janeiro de 2022.

QUEIROZ, F. O; ALVES, J. O; FERREIRA, D. C; SILVA, M. B. Processo de reaproveitamento da água da vinhaça. **Centro científico conhecer,** v.14, p.1395, 2017.

REECE, N. N. **Optimizing aconitate removal during clarification.** Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2003.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION – RFA. Annual world fuel ethanol production (Mil. Gal.). Disponível em: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production > Acessado em: 12 jan 2022.

ROBERTIELLO, A. Upgradin of agricutural and agroindustrial wastes: the treatment of distillery efluentes (vinasses) in Italy. **Agric Wastes,** v.4, p.387-395, 1982.

ROBERTS, E. J; MARTIN, L.F. Identification and determination of nonnitrogenous organic acids of sugar cane by partition chromatography. **Analytical Chemistry,** v.26, p.815-818, 1954.

ROLIM, M. M. **Avaliação físico-mecânica do material solo-vinhaça concentrada e sua utilização para fins de fabricação de tijolos**. Dissertação (Mestre em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1996.

ROLIM, M. M; LYRA, M. R. C. C; DUARTE, A. D; MEDEIROS, P. R. F; SILVA, E. F. F; PEDROSA, E. M. R. Influência de uma lagoa de distribuição de vinhaça na qualidade da água freática. **Revista Ambiente e Água,** v.8, p.155-171, 2013.

ROSSETTO, A. J. Utilização agronômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: PARANHOS, S. B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: **Fundação Cargill,** 1987.

RUTZ, D; JANSSEN, R. Types of Biofuels. *In:* Biofuel Technology Handbook. 1 ed: **WIP Renewable Energies,** 2007.

SALOMON, K. R. **Avaliação Técnico-economica e Ambiental da utilização do biogas proveniente da biodigestão da vinhaça em tecnologias para geração de eletricidade.** Tese (Doutora em Engenharia Mecanica) – Instituto de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2007.

SANTANA, H. **Isolamento, seleção e caracterização de microalgas com alta produtividade de biomassa em meio de cultivo a base da vinhaça.** Dissertação (Mestre em Biociências) – Instituto multidisciplinar em saúde da Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista, 2016.

SANTOS, J. S; SANTOS, M. L. P; AZEVEDO, A. S. Validação de um método para determinação simultânea de quatro ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em polpas de frutas congeladas. **Química Nova,** v.37, p.540 – 544, 2014.

SANTOS, S. C; ROSA, P. R. F; SAKAMOTO, I. K; VARESCH, M. B. A; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal of Hydrogen Energy,** v.39, p.9000-9011, 2014.

SANTOS, T. M. V; SANTOS, M. A. L; SANTOS, G. C; SANTOS, V. R; PACHEDO, D. S. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microorganismos do solo. **Caatinga,** v.22, p.155 – 160, 2009.

SCHNEIDER, C. F; SHULZ, D. G; LIMA, P. R; JÚNIOR, A. C. G. Formas de gestão e aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando redução de impactos ambientais**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.7, 2012.

SCULL, I; SAVÓN, L; GUTIÉRREZ, O; VALIÑO, E; ORTA, I; MORA, P. O; ORTA, H; RAMOS, Y; MOLINEDA, A; COTO, G; NODA, A. Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v.46, 2012.

SEDENHO, G. C; SILVA, J. L; BELUOMINI, M. A; SÁ, A. C; STRADIOTTO, N. R. Determination of electroative organic acids in sugarcane vinasse by high performance anion-exchange chormatography with pulsed amperometric detection using a nickel nanoparticle modified boron-doped diamond. **Energy and fels.** v3, p. 2865 – 2870, 2017.

SERAFIM, F. A. T. **Ácidos orgânicos em aguardentes de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010.

SEQUEIRA, C. B. **Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais:** aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrônica. Dissertação (Mestre em Qualidade e segurança alimentar) – Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2012.

SILVA, A. P. M da; BONO, J. A. M; PEREIRA, F, de A. R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. Campina Grande, PB, UAEA/UFCG. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, 2014.

SILVA, C. G. A. **Desenvolvimento de fases estacionárias C18 termicamente imobilizadas sobre sílica e sílicas metalizadas e suas caracterizações químicas, físicas e cromatográficas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiências (CLAE) e a cromatografia com fluído supercríticos (CFS).** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SILVA, G. S. P. L; SILVA, F. C; ALVES, B. J. R; TOMAZ, E; BERTON, R. S; MARCHIORI, L. F. S; SILVEIRA, F. G. Efeitos da aplicação da vinhaça “in natura” ou concentrada associado ao n-fertilizante em soqueira de cana-de-açúcar e no ambiente. **Holos Envvironment,** v.19, p.1-21, 2018.

SNYDER, C. H. The extraordinary chemistry of ordinary things. 2ª ed. New York: **John Wiley & Sons**, 1995.

SOPRAL. Avaliação do Vinhoto como Substituto do Oleo Diesel e Outros Usos. **Coleção SOPRAL**, n° 10. Sociedade de Produtores de Açúcar e Álcool – SOPRAL, Sao Paulo, 1986.

SOUZA, E. L; DAMASCENO, F; SCHIRMER, G. K; RAMIRES, M. F; BISOGNIN, R. P; BOHRER, R. E. G; VASCONCELOS, M. C; CEZIMBRA, J. C. G. Resíduos contaminantes no solo: possibilidades e consequências. **Gestão & Sustentabilidade Ambiental** v.7, p.484 – 509, 2018.

SRIVASTAVA, V. C; MALL, I. D; MISHRA, I. M. Adsorptive removal of phenol by bagasse fly ash and activated carbono: equilibrium, kinetics and thermodunamics. **Colloids ands Surfaces,** v. 272, 2005.

STUPIELLO, J. P. Fisiologia da Cana-de-açúcar. **Congresso Nacional da STAB,** 2016.
.
Suplemento especial aminoácidos. **Aditivos & Ingredientes,** v87, p.1 – 11, 2012. Disponível em <https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201604/20160409062580014606370 22.pdf>. Acessado em 07 de março de 2020.

SZYMANSKI, M. S. E; BALBINOT, R; SCHIMER, W. N. Biodigestão anaeróbica da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso. **Ciências Agrárias,** v.31, p.901 – 912, 2010.

THAI, C; DOHERTY, W. The composition of sugarcane juices derived from burnt cane and whole green cane crop. **Proceedings of the 33rd Annual Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists,** p.368-376, 2011.

TOLEDO, V. V; GANCHO, C. V. Verdes canaviais. 3 ed. São Paulo: **Moderna,** 1996.

TRAN, H. N.;YOU, S. J.; HOSSEINI-BANDEGHARAEI, A.; CHAO, H. P. Mistakes and inconsistencies regarding adsorption of contaminants from aqueous solutions: A critical review. **Water Research,** v. 120, p. 88-116, 2017.

TUNDO, P; CLACK. S; MEMOLI, S. Speacial topic issue on Green Chemestry. **Pure and applied chemestry.** v.72, p.1207 – 1403, 2000.

UNITED STATES Environmental Protection Agency. Green Chemistry. Disponível em: < https://www.epa.gov/greenchemistry > Acessado em 17 outubro 2021.

VADIVEL, R; MINHAS, P. S; KUMAR, S. P; SINGHT, Y; RAO, N. D. V. K; NIRMALE, A. Significance of vinasses waste management in agriculture and environmental quality- Review. **African Journal of Agricultural Research**. v.9, p.2862-2873, 2014.

VAZ, S. Uso dos coprodutos e resíduos de biomassa para obtenção de produtos químicos renováveis. **Embrapa**, 2010.

VIANA, L. G; CRUZ, P. S. Reaproveitamento de resíduos agroindustriais. **IV Congresso Baiano de Engenharia Sanitária e Ambiental,** 2016.

VIEIRA, F. S.; RIBEIRO, J. A. A.; RODRIGUES, C. M. Desenvolvimento da metodologia LC-MS/MS para análises de ácidos dicarboxílicos provenientes da conversão lignina. **VI Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia: Anais**, 2020.

WALFORD, S. N. Composition of cane juice. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association,** v. 70, p. 265-266, 1996.

WALFORD. S. N. Applications of ion chromatography in cane sugar research and process problems. **Journal of Chromatography A**, v.956, p.187. 2002.

WALTHEW D. C. Aspects of evaporator scale formation and control in the South african sugar industry. **Proceedings of the Conference on Sugar Processing Research**, 1996.

YUSUF, M. Agro-industrialwaste materialsand their recycled value-added aplications: review. *In:* Handbook of Ecomaterials. Ed. **Springer-Nature**, 2017.

ZAIAT, M. Vinhaça para gerar energia. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2015/12/15/vinhaca-para-gerar-energia/> Acessado em 2 de dezembro 2021.

ZAPATA, N. J. G. **Aconitic acid from sugarcane: production and industrial application.** Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2007.