

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM AMOSTRAS DE VINHAÇAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA****Luiza Coatti (*), Milla de Almeida Araújo, Yussra Abdul Ghanin, Renata Colombo***Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo; e-mail: luiza.coatti@usp.br**RESUMO**

A produção de etanol nas usinas sucroalcooleiras geram, durante o processo, diversos subprodutos em larga escala. Entre estes subprodutos está a vinhaça, um efluente que é produzido na ordem de 9 a 17 L para cada litro de etanol. Atualmente parte deste montante de vinhaça é utilizada na fertirrigação da cultura de cana-de-açúcar e o excedente é armazenado em valas de contenção a céu aberto, construídas próximas às destilarias. Devido ao seu alto teor de matéria orgânica e elevada acidez, ambas as disposições de vinhaça, quando efetuada de forma irregular, têm gerado problemas ambientais, tais como, contaminação de águas e atmosfera e alteração das propriedades do solo. Os ácidos presentes nesse efluente são responsáveis por acidificar o pH do solo alterando a sua biota e a produtividade da cultura. No entanto, os principais ácidos relatados na cana, e possivelmente presentes na vinhaça, são empregados em diversos setores industriais. A produção industrial destes ácidos tem sido feita através de processos fermentativos de difícil controle e/ou através da utilização de reagentes originários do petróleo. Desta forma, visando propor um melhor aproveitamento da vinhaça na fertirrigação, bem como, o aproveitamento dos ácidos deste subproduto, neste trabalho realizou-se um estudo do perfil qualitativo e quantitativo dos ácidos orgânicos presentes na vinhaça. Inicialmente foi realizada a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de padrões dos ácidos majoritários da cana-de-açúcar: aconítico, málico, maleico, malônico, láctico, cítrico, tartárico, oxálico, glicólico, glutâmico e succínico. Posteriormente, os ácidos de cinco amostras de vinhaça foram extraídos, utilizando a técnica de Extração em Fase Sólida (EFS), e também foram analisados por CLAE. Os dados obtidos mostraram que os ácidos aconítico, málico e glicólico estão presentes em todas as amostras de vinhaça, sendo que o aconítico e málico foram os que apresentaram maiores concentrações (0,016 a 12,555 gL⁻¹). Os ácidos maleico e malônico foram detectados em duas vinhaças e apresentaram as menores concentrações nas amostras de vinhaça estudada (0,00013 a 0,117 gL⁻¹). A presença dos demais ácidos se alternou entre as amostras de vinhaça analisada e os seus teores também foram distintos em cada uma delas. Com base nos teores e na frequência em que foram constatados os referidos ácidos é possível concluir que a vinhaça tem potencial de ser empregada como fonte alternativa para a obtenção desses ácidos orgânicos.

PALAVRAS-CHAVE: Vinhaça, Ácidos orgânicos, CLAE**ABSTRACT**

The production of ethanol in the sugar and alcohol plants generates, during the process, several by-products on a large scale. Among these by-products is vinasse, an effluent that is produced in the order of 9 to 17 L for each liter of ethanol. Currently, part of this vinasse amount is used in the fertigation of the sugarcane crop and the surplus is stored in open pit containment ditches, built close to the distilleries. Due to its high content of organic matter and high acidity, both vinasse provisions, when carried out irregularly, have generated environmental problems, such as contamination of water and atmosphere and alteration of soil properties. The acids present in this effluent are responsible for acidifying the pH of the soil, changing its biota and the productivity of the crop. However, the main acids reported in sugarcane, and possibly present in vinasse, are used in several industrial sectors. The industrial production of these acids has been carried out through fermentation processes that are difficult to control and / or through the use of reagents originating from petroleum. Thus, in order to propose a better use of vinasse in fertigation, as well as the use of acids from this by-product, in this work a study of the qualitative and quantitative profile of organic acids present in vinasse was carried out. Initially, the analysis using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of patterns of major sugarcane acids: aconitic, malic, maleic, malonic, lactic, citric, tartaric, oxalic, glycolic, glutamic and succinic. Subsequently, the acids from five vinasse samples were extracted, using the Solid Phase Extraction (EFS) technique, and were also analyzed by HPLC. The data obtained showed that aconitic, malic and glycolic acids are present in all vinasse samples, with aconitic and malic acids having the highest concentrations (0,016 to 12,555 gL⁻¹). Maleic and malonic acids were detected in two vinasse and had the lowest concentrations in the studied vinasse samples (0,00013 to 0,117 gL⁻¹). The presence of the other acids alternated between the analyzed vinasse samples and their levels were also different in each one. Based on the contents and the frequency in which these acids were found, it is possible to conclude that vinasse has the potential to be used as an alternative source to obtain these organic acids.

KEY WORDS: Vinasse, Organic acids, HPLC



INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores de etanol, com uma produção de 35,5 bilhões do biocombustível proveniente de cana-de-açúcar em 2020 (RFA, 2020). A produção do etanol nas usinas sucroalcooleiras envolve diferentes etapas e, durante o processo, diversos resíduos são gerados. Dentre estes resíduos, a vinhaça se destaca pelo montante produzido (9 a 17 L para cada litro de etanol). Também conhecida como vinhoto ou restilo, a vinhaça é um efluente líquido com sólidos em suspensão que é gerada na etapa de destilação do vinho (DIAS et al., 2015; CONAB, 2015; NETO, 2016).

O principal constituinte da vinhaça é a matéria orgânica, composta principalmente por ácidos orgânicos que corresponde a 13 % do total de compostos carbonáceos, juntamente com açúcares, polióis e carboidratos não fermentáveis. A vinhaça também possui uma composição inorgânica, tais como potássio, fósforo, nitrogênio, magnésio, cálcio e sulfatos e outros nutrientes em menores quantidades como ferro, manganês e zinco (CONAB, 2015; VADIVEL et al., 2014).

Após a sua produção, a vinhaça é armazenada em valas de contenção próximas as usinas, onde permanecem até serem transportadas para o campo para ser empregada na fertirrigação da lavoura de cana-de-açúcar. A fertirrigação é o principal rota de aproveitamento da vinhaça atualmente por apresentar uma composição rica em nutrientes para o solo, como potássio e nitrogênio trazendo benefícios como correção do solo e nutrição para a plantação (LAIME et al., 2011; DRUMOND; BARBOSA; FRANÇA, 2013; PIRES; FERREIRA, 2008).

No entanto, estudos amostram que a contenção da vinhaça à céu aberto vem gerando impactos socioambientais tais como a lixiviação de metais, percolação dos compostos orgânicos e inorgânicos no solo, entre outros. A aplicação deste efluente na lavoura também é limitada, devido seu alto teor de matéria orgânica, responsável por diversos efeitos negativos como alteração da biota do solo, e elevada acidez podendo acidificar o solo, se aplicada sem controle (LAIME et al., 2011; VADIVEL et al., 2014).

A elevada acidez da vinhaça é decorrente da presença de diversos ácidos orgânicos extraídos da cana-de-açúcar e/ou provenientes do processo de produção do etanol. Dados da literatura mostram que os principais ácidos presentes na cana-de-açúcar e na vinhaça são o aconítico, málico, maleico, cítrico, tartárico, malônico, oxálico, glicólico, glutâmico, láctico e succínico (PARNAUDEAU et al., 2008; MORALES et al., 2002). Os referidos ácidos são empregados em diversos setores industriais (alimentício, farmacêutico, cosmético, têxtil, química fina, entre outros) e são atualmente fabricados através de procedimentos fermentativos e/ou com o uso de reagentes tóxicos, como derivados do petróleo (CHEN; NIELSEN, 2016; VADIVEL et al., 2014).

Tendo em vista o potencial da vinhaça como fertilizante a eliminação dos ácidos orgânicos presentes neste efluente poderia viabilizar um maior aproveitamento do mesmo na agricultura. Adicionalmente, a extração destes ácidos, poderiam contribuir com a demanda industrial por estes compostos minimizando os atuais impactos relacionados às suas atuais rotas de produção.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo qualitativo e quantitativo dos ácidos orgânicos presentes na vinhaça, com o intuito de utilizar a vinhaça como uma fonte alternativa para extrair esses ácidos orgânicos e proporcionar um melhor aproveitamento do efluente na fertirrigação.

METODOLOGIA

Amostras de Vinhaça

Foram analisadas cinco amostras de vinhaça provenientes das usinas 1 (Araraquara - SP), safra de 2018/2019; 2 (Araras - SP), safra 2016/2017; 3 (Araraquara - SP), safra de 2017/2018; 4 (Frutal - MG), safra de 2015/2016 e 5 (Frutal - MG), safra de 2015/2016. As amostras foram coletadas diretamente do duto de saída do destilador da usina em frascos âmbar, levadas até o laboratório e armazenadas em freezer até o momento de sua utilização.

Preparo das soluções dos padrões analíticos

Os ácidos orgânicos analisados foram selecionados de acordo com a revisão da literatura: aconítico, cítrico, málico, láctico, tartárico, oxálico, glutâmico, maleico, malônico, succínico e glicólico (MORALES et al., 2002). Foram preparadas soluções estoques individuais em água ultrapura na concentração de 1000 mgL⁻¹. A mistura dos ácidos foi preparada em água ultrapura com as seguintes concentrações de cada ácido: 90,91 mgL⁻¹ para o cítrico, malônico, tartárico, succínico, glutâmico e málico; 2,27 mgL⁻¹ para o aconítico e láctico; 0,95 mgL⁻¹, para o maleico; 22,73 mgL⁻¹ para o oxálico; e 3,79 mgL⁻¹ para o glicólico. Todas as soluções foram filtradas em membranas de politetrafluoretileno hidrofílico de poro 0,45 µm e diâmetro de 13 mm e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV/DAD).

Extração dos ácidos orgânicos da vinhaça

Para eliminação de interferentes e obtenção de uma fração rica em ácidos orgânicos foi realizado um processo de extração em fase sólida (SPE) em cada uma das amostras de vinhaça. Para esta extração, inicialmente eliminou-se o material particulado através da centrifugação de 13 mL de vinhaça à 4000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante resultante desta etapa foi submetido ao processo de SPE com cartucho Strata C18-E, previamente condicionado com 8 mL de metanol e 8 mL de água. Após o condicionamento do cartucho, aplicou-se 6 mL do sobrenadante da vinhaça. Descartou-se os 3 primeiros mililitros (volume correspondente à água remanescente do condicionamento) e o restante do volume (3 mL) foi coletado. As frações de vinhaças eluídas do cartucho foram diluídas com água ultrapura em diferentes proporções [1:18 (v/v) para a vinhaça 1, 1:200 (v/v) para a vinhaça 2, 1:9 (v/v) para a vinhaça 3, 1:50 (v/v) para a vinhaça 4 e 1:10 (v/v) para a vinhaça 5], de forma a padronizar a concentração dos ácidos de cada vinhaça. Em seguida realizou-se a filtração das amostras diluídas membranas de politetrafluoretileno hidrofílico de poro 0,45 µm e diâmetro de 13 mm e analisou-se por CLAE-UV/DAD (MAPA, 2019).

Análise por CLAE-UV/DAD

Para a realização das análises por CLAE-UV/DAD, foi utilizado um cromatógrafo líquido Prominence LC 20 AT da Shimadzu Corporation, com a coluna Shim-pack XR-ODS II C18 (100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm). A fase móvel foi constituída de uma solução tampão constituída por 70 g/L de dihidrogenado de potássio e 14 g/L de sulfato de amônio, com pH corrigido para 2,1 com ácido ortofosfórico. O modo de eluição foi isocrático, com fluxo de 0,2 mLmin⁻¹, temperatura de 20 °C, 10 µL, detecção à 210 nm e tempo de análise de 20 minutos.

As soluções padrões dos ácidos individuais e da mistura de todos os ácidos foram analisadas previamente para a determinação do tempo de retenção (TR) de cada um deles nesta metodologia. Posteriormente analisou qualitativa e quantitativamente as amostras de vinhaça.

RESULTADOS

O perfil cromatográfico da mistura dos ácidos orgânicos está representado na Figura 1. A metodologia empregada para a separação dos ácidos orgânicos foi satisfatória, pois foi possível identificar todos os picos dos ácidos, com exceção dos ácidos tartárico e oxálico que apresentaram mesmo TR. Foi detectado na mistura dos padrões dois picos, A e B, nos tempos de retenção de 15,5 e 17,4 minutos, respectivamente, que apresentaram um perfil UV característico de ácido orgânico e que não corresponde a nenhum dos tempos de retenção dos padrões analisados.

O padrão individual do ácido aconítico apresentou dois picos (TR = 10,8 e 15,5 min), desta forma, sabendo que este padrão analítico utilizado apresenta pureza de 98 % e a abundância dos picos está relacionada com a sua concentração, atribuiu-se ao pico de maior intensidade (TR = 10,8 min) a identificação de ácido aconítico e o pico de TR de 15,5 min (pico A) corresponde ao aconitato, base conjugada do ácido aconítico, relatado na literatura como um derivado do ácido aconítico em canas imaturas (nos colmos, nas folhas e pontas) (REECE, 2003). O pico B, será identificado na próxima etapa do trabalho através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

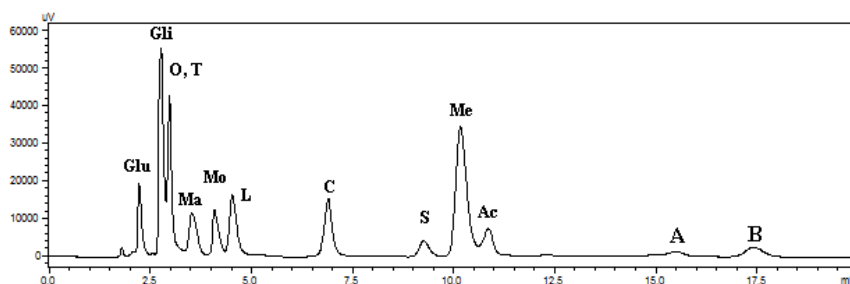


Figura 1: Cromatograma CLAE-UV da mistura de 11 padrões dos ácidos orgânicos: aconítico (A), cítrico (C), succínico (S), málico (Ma), maleico (Me), malônico (Mo), tartárico (T), oxálico (O), glutâmico (Glu), láctico (L) e glicólico (Gli). Condições Cromatográficas: coluna C18 (Shim-pack XR-ODS II - 100 mm x 3,0 mm x 2,2 µm), método isocrático, de eluição de 100% de uma solução tampão de 3mM 70 g/L KH₂PO₄/ 14 g/L (NH₄)₂SO₄ acidificada com ácido Ortofosfórico (pH = 2,1) a 210 nm. Fonte: Autor do Trabalho



Comparando o cromatograma da Figura 1 com os cromatogramas das demais vinhaças, foi possível detectar os ácidos presentes em cada amostra de vinhaça. A Tabela 1 apresenta quais ácidos foram detectados em cada uma delas e a concentração em mgL^{-1} .

Tabela 1. Concentração dos ácidos orgânicos nas amostras de vinhaça.

Fonte: Autor do Trabalho.

Ácidos Orgânicos	Vinhaça (g.L^{-1})				
	1	2	3	4	5
Aconítico	1,450	12,555	0,535	3,381	0,537
Cítrico	1,157	8,437	0,247	-	0,404
Glicólico	0,018	0,260	0,003	0,031	0,005
Glutâmico	0,561	6,311	0,261	-	0,593
Lático	0,099	0,334	-	0,175	0,019
Maleico	0,00	0,00	0,00076	-	0,00013
Málico	1,257	9,136	0,016	3,423	0,107
Malônico	-	-	-	2,660	0,059
Succínico	1,002	-	0,117	-	0,234
Tartárico/Oxálico	0,503	6,299	0,105	1,379	2,701
Total	6,051	43,335	1,288	11,051	4,663

Dentre os onze padrões analíticos analisados, os ácidos aconítico, málico e glicólico foram os que se demonstraram mais frequentes nas cinco amostras de vinhaça analisadas. Sendo o aconítico e o málico os que apresentaram as maiores concentrações em todas as amostras, variando os teores entre cada uma delas. Esses resultados corroboram com a literatura onde o ácido aconítico é relatado como principal ácido do caldo da cana-de-açúcar (aproximadamente 84 %) seguido pelo ácido málico (aproximadamente 14 %). O ácido glicólico é relatado como presente na cana-de-açúcar, mas em baixas concentrações (GUITIERREZ; FERRARI; ORELLI JR, 1989; ARAÚJO, 2017).

Os ácidos oxálico e tartárico foram coeluídos e será necessário realizar futuramente uma análise para a confirmação de qual destes dois ácidos está presente em cada vinhaça ou se trata-se de ambos. A literatura descreve que os ambos se encontram em abundância e frequência similares no caldo da cana-de-açúcar (ARAÚJO, 2017).

Os ácidos glutâmico, cítrico e lático, foram detectados em pelo menos quatro das amostras analisadas, o succínico em três amostras e os ácidos malônico e maleico foram os menos frequentes sendo encontrados apenas em duas das vinhaças analisadas. Os ácidos glutâmico, cítrico, succínico e malônico são detectados na cana de acordo do seu grau de maturidade e sabendo que as amostras de vinhaças são provenientes de locais e safras diferentes, elas podem ser de diferentes estágios de maturação justificando a ausência e a variação de teores destes ácidos nas vinhaças. O ácido lático está relacionado ao processo de produção do caldo que é submetido, e por serem provenientes de diferentes usinas, a variação dos teores deste ácido pode estar relacionada à prováveis variações do processo produtivo destas usinas. O ácido maleico é relatado em baixas concentrações quando comparados com os ácidos aconítico e oxálico (GUTIERREZ; FERRARI; ORELLI JR, 1989).

Com relação ao composto A, atribuído ao aconitato, este foi detectado em todas as amostras de vinhaça. O ácido B, ainda não foi identificado, foi detectado nas vinhaças 2, 3 e 5.

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 destacar a composição do solo, o clima, a safra, sazonalidade, maturação da cana, o processo de colheita, a origem do mosto e o tipo de fermentação empregados no processo produtivo da usina sucroalcooleira (NETO, 2016; ARAÚJO, 2017).

CONCLUSÕES

Conclui-se que foi possível detectar nas diferentes amostras vinhaça 11 diferentes tipos de ácidos orgânicos. A quantificação destes ácidos mostrou que as vinhaças contêm uma composição de ácidos com variações em relação às concentrações, no entanto, de uma forma geral foi possível detectar alguns ácidos em comum entre elas e em concentrações pertinentes à extração e reaproveitamento. Desta forma, conclui-se que a vinhaça tem potencial de ser empregada como fonte alternativa para a obtenção desses ácidos orgânicos, contribuindo com a demanda dos setores industriais que fazem uso destes ácidos e diminuindo o teor de matéria orgânica e a acidez da vinhaça, viabilizando um melhor aproveitamento na fertirrigação.

**AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Chen, Y., Nielsen, J. **Biobased organic acid production by metabolically engineered microorganisms**. *Current Opinion in Biotechnology*, v.37, p.165-172, 2016.
3. Companhia Nacional De Abastecimento (CONAB). **Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. Brasília: CONAB, 2015.
4. 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.
5. 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.
6. Gutierrez, L. E., Ferrari, S. E., Orlli Jr, A. A. **Ácidos orgânicos de folhas de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) em quatro estádios de maturidade**. *An. Esalq*, v.45, p.441-452, 1989.
7. 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.
8. 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 março de 2021.
9. Morales, A. A., Victória, H. M., Godshall, M. A., Jaramillo, A. A., Larrahondo A., Jesus, E., Grimm, C. **Identification of organic compounds in vinasse**. *Proceedings of the Sugar. Processing Research Conference*, 2002.
10. Neto, A. E. **Estado da arte da vinhaça**. Piracicaba (SP): União da Indústria de Cana-de-Açúcar. 2016.
11. Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazvielle, 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.
12. 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.
13. Reece, N. N. **Optimizing aconitate removal during clarification**. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2003.
14. Renewable Fuels Association (RFA). **Annual world fuel ethanol production (Mil. Gal.)**. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>> Acessado em: 18 abril 2020.
15. 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.