

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Ácidos graxos e compostos fenólicos como substâncias  
fitotóxicas nos resíduos agroindustriais: vinhaça, torta de  
filtro e bagaço**

**Fatty acids and phenolic compounds as phytotoxic substances in agro-  
industrial waste: vinasse, filter cake and bagasse**

**Dandara Alves Luz**

**Dissertação de Mestrado em Química**

**Vitória  
2018**

**Dandara Alves Luz**

Ácidos graxos e compostos fenólicos como substâncias  
fitotóxicas nos resíduos agroindustriais: vinhaça, torta de filtro e  
bagaço

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química

**Área de Concentração:** Química

**Linha de Pesquisa:** Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr<sup>o</sup>. Ricardo Machado Kuster

Coorientador(a): Profa. Dr<sup>a</sup>. Anne Caroline Candido Gomes

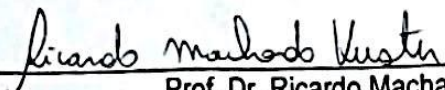
**VITÓRIA  
2018**


"Ácidos graxos e compostos fenólicos como substâncias  
fitotóxicas nos resíduos agroindustriais: vinhaça, torta de filtro e  
bagaço"

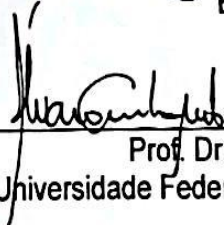
Dandara Alves Luz

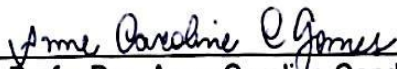
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de  
Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial  
para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada em 16/02/2018 por:

  
Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

  
Prof. Dr. Roberto Pereira Santos  
Instituto Federal do Espírito Santo  
Examinador Externo

  
Prof. Dr. Alvaro Cunha Neto  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinador Interno

  
Profa. Dra. Anne Caroline Candido Gomes  
Instituto Federal do Rio de Janeiro  
Coorientadora

Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, fevereiro de 2018

- Luz, Dandara Alves, 1988-  
L979a      Ácidos graxos e compostos fenólicos como substâncias  
fitotóxicas nos resíduos agroindustriais : vinhaça, torta de filtro e  
bagaço / Dandara Alves Luz. – 2018.  
145 f. : il.

Orientador: Ricardo Machado Kuster.  
Coorientador: Anne Caroline Candido Gomes.  
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Agroindústria canavieira. 2. Cana-de-açúcar. 3. Vinhaça. 4.  
Reaproveitamento (Sobras, refugos, etc.). 5. Fitotoxicidade. I.  
Kuster, Ricardo Machado. II. Gomes, Anne Caroline Candido. III.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Exatas. IV. Título.

CDU: 54

---

Dedico esta dissertação a amada minha mãe  
Vilma, por todo amor, força e ajuda e a  
minha inesquecível vovó Alicia por ter sido  
exemplo de calma e superação!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a primeiramente a Deus, por nunca ter me desamparado, e com toda a sua misericórdia me mostrado que eu podia ir mais, por me capacitar nessa jornada.

A minha mãe Vilma Alves Luz, por ter sido sempre exemplo de determinação e força, por ter me confortado nos momentos que precisei e por ter me dado tanto amor à vida toda. Te amo!

Ao meu orientador professor Dr<sup>o</sup> Ricardo Machado Kuster, pela oportunidade de conhecimento e crescimento, por ser um incentivador da ciência, pela paciência, ajuda e direção.

A minha orientadora professora Dr<sup>a</sup> Anne Caroline Candido Gomes, por ter realizado os bioensaios de fitotoxicidade na UFRJ, pela disponibilidade em responder minhas dúvidas e me direcionar mesmo longe e por ter se tornado uma amiga querida.

Ao Leonardo Martins Perozini, por me estender as mãos em diversos momentos, por me ouvir, incentivar e aconselhar, e não menos importante pela ajuda com a coleta das amostras.

A Letícia Campos Puziol e Polianna Silva Ferreira, ICs do laboratório pelas palavras de apoio e incentivo, pelo aprendizado compartilhado, e pelas análises.

Ao laboratório de produtos naturais e ensaios biológicos (Labproneb) da Faculdade de Farmácia da UFRJ, pelo acolhimento para que os ensaios biológicos fossem realizados, em especial a professora Dr<sup>a</sup> Naomi Kato Simas.

As colegas do laboratório de cromatografia, Cristina Tosta e Samantha Ribeiro, obrigada pelas análises. Estendo esse agradecimento aos alunos do Laboratório de petroleômica e forense.

Aos laboratórios de orgânica I, orgânica II, águas, espectrometria atômica e petroleômica e forense, pelo empréstimo de material quando necessário.

Ao PPGQUI por todo suporte para que esse trabalho fosse realizado.

Aos docentes do PPGQUI que pelo conhecimento compartilhado.

A todos os colegas do NCQP, em especial Natã Carlos Madeira e Leandro Eleotério, pelas conversas e troca de experiências e por todo apoio ao longo destes dois anos.

Ao professor Rodrigo Scherer, e a IC Camile Costa Zanichelli da Universidade Vila Velha pela ajuda com a análise de fenólicos totais.

Aos meus tios Heliomar da Vitória e Cecília Machado da Vitória, bem como minhas primas Priscila Machado da Vitória e Viviane Machado da Vitória pela grande amizade e apoio durante toda a minha vida. A minha tia Cleonice Alves da Silva agradeço por todas as orações e o enorme carinho. A minha tia-avó Analicia Barros, meu muito obrigada por todo seu carinho e por torcer pelas minhas vitórias.

A Edleia da secretaria do NCQP, muito obrigada pelas palavras gentis e por ser tão solícita. A Néide por me ouvir e pelo carinho.

Ao Alex, secretário do PPGQUI, por sempre estar disponível quando algum pedido era feito, pelas conversas sobre mestrado/doutorado e Caratinga-MG.

A Usina Paineiras, por ceder os resíduos, vinhaça e torta de filtro para que esse trabalho fosse possível, e em especial aos funcionários Valnei Costa Pereira (analista de planejamento), Calebe Silva Pereira (gerente industrial), Riellys Hignachiti Cacilhas (controle de qualidade) e Martha Meireles Damasceno Freitas (secretária), por serem tão solícitos e disponíveis todas as vezes que os procurei.

Agradeço aos professores Álvaro Cunha Neto e Roberto Pereira Santos, por aceitarem compor a banca de avaliação.

Ao LabPetro, Capes e CNPq.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.”

(Martin Luther King)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Saccharum officinarum</i> .....	26
Figura 2. Estrutura do ácido aconítico.....	44
Figura 3. Estrutura do carvacrol.....	44
Figura 4. Estrutura do herbicida Nicosulfuron.....	45
Figura 5. Estrutura do galato de metila.....	45
Figura 6. Estrutura do (a) DIMBOA; (b) BOA.....	46
Figura 7. Estrutura do (a) <i>trans</i> -ferúlico; (b) <i>cis</i> -ferúlico; (c) vanílico e (d) siríngico.....	47
Figura 8. Estruturas do (a) ácido benzóico; (b) decano; (c) diacetil glicol; (d) ácido metil hexadecanoico e (e) éster do ácido ftálico.....	48
Figura 9. Estruturas do (a) ácido palmítico; (b) ácido esteárico; (c) ácido linoleico e (d) ácido 8,11,14-docosatrienoico.....	49
Figura 10. Estruturas do (a) ácido 3,4-dimetoxibenzóico; (b) ácido <i>p</i> -metoxicinâmico; (c) ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico e (d) ácido 3,4-dimetoxicinâmico.....	49
Figura 11. Estrutura do ácido (a) 9-epoxi-12-octadecenoico; (b) 12-epoxi-9-octadecenoico; (c) 9,10-dihidroxi-12-octadecenoico; (d) 12,13-didroxi-9-octadecenoico; (e) 9-epoxi-12,15-octadecadienoico; (f) 12-epoxi-9,15-octadecadienoico; (g) 15-epoxy-9,12-octadecadienoico e (h) 13-hidroxi-9, 11, 15-octadecatrienoico.....	51
Figura 12. Estrutura do ácido cinâmico.....	52
Figura 13. Estrutura do ácido (a) cafeico; (b) <i>p</i> -cumárico e (c) sinápico.....	53
Figura 14. Estrutura ácido clorogênico.....	53
Figura 15. Estruturas do ácido (a) <i>p</i> -hidroxibenzoico; (b) protocatecuico e flavonoide (c) miricetina.....	54
Figura 16. Estruturas do flavonoide (a) quercetina e (b) nanningenina.....	54
Figura 17. Espectro de massas por ESI (-) da amostra VBruta.....	73
Figura 18. Espectro de massas por ESI (-) da amostra VHex.....	73
Figura 19. Espectro de massas por ESI (-) da amostra VDiCl.....	74
Figura 20. Espectro de massas por ESI (-) da amostra VAcOEt.....	75
Figura 21. Espectro de massas por ESI (-) da amostra Vaq.....	75
Figura 22. Espectro de massas por ESI (-) da amostra EDV.....	76
Figura 23. Espectro de massas por ESI (-) da amostra ADV.....	77
Figura 24. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFDiCl.....	77

Figura 25. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFEtOH. ....	78
Figura 26. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFMeOH. ....	78
Figura 27. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFSapoH. ....	79
Figura 28. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFSapoD. ....	79
Figura 29. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFAq. ....	80
Figura 30. Espectro de massas por ESI (-) da amostra BMeOH. ....	80
Figura 31. Espectro de massas por ESI (-) da amostra BSapoD. ....	81
Figura 32. Ácidos graxos identificados em cana-de-açúcar. (a) palmítico; (b) esteárico; (c) oleico e (d) linoleico. ....	82
Figura 33. Compostos fenólicos identificados em amostras de cana-de-açúcar ou em produtos obtidos a partir da planta. ....	83
Figura 34. Isômeros do ácido cafeoilquínico e isômeros do ácido feruloilquínico identificados em cana-de-açúcar. (a) 3-cafeoilquínico; (b) 4-cafeoilquínico; (c) 5-cafeoilquínico; (d) 3-feruloilquínico; (e) 4-feruloilquínico e (f) 5-feruloilquínico. ....	83
Figura 35. Flavonoides identificados em cana-de-açúcar. Sendo, Ara: arabinose e Glc: glicose. ....	84
Figura 36. Estruturas das oxilipinas, (A) ácido 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico, (B) ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico e (C) ácido 9,10,13-trihidroxi-11-octadecenoico. ....	85
Figura 37. Espectros de ESI (-) -MS/MS (DIC) para os íons de $m/z$ 327 e $m/z$ 329. ....	85
Figura 38. Proposta de fragmentação do íon 327. ....	87
Figura 39. Proposta de fragmentação do íon 329. ....	88
Figura 40. Proposta de fragmentação do íon 329 gerando fragmento $m/z$ 201. ....	88
Figura 41. Cromatograma em fase gasosa da amostra VHex. ....	92
Figura 42. Cromatograma em fase gasosa da amostra VDiCl. ....	93
Figura 43. Cromatograma em fase gasosa da amostra VAcOEt. ....	93
Figura 44. Cromatograma em fase gasosa da amostra EDV. ....	94
Figura 45. Cromatograma em fase gasosa da amostra ADV. ....	95
Figura 46. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFDiCl. ....	96
Figura 47. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFEtOH. ....	96
Figura 48. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFMeOH. ....	97
Figura 49. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFSapoH. ....	97
Figura 50. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFSapoD. ....	98

Figura 51. Cromatograma em fase gasosa da amostra BMeOH.....	98
Figura 52. Cromatograma em fase gasosa da amostra BSapoD.....	99
Figura 53. Estrutura ácido 11, 13-dien-mulin-20-ioco.....	113
Figura 54. Estrutura 2-hidroxi-5-metoxi-3-[(Z,Z)-8',11',14'-pentadecatrieno]- <i>p</i> -benzoquinona.....	114
Figura 55. Estrutura glifosato.....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes do bagaço da cana-de-açúcar. ....	31
Tabela 2. Propriedades químicas do bagaço da cana-de-açúcar. ....	31
Tabela 3. Composição inorgânica média da vinhaça. ....	33
Tabela 4. Composição orgânica Vinhaça (68.5° Brix) ....	34
Tabela 5. Composição química da torta de filtro. ....	36
Tabela 6. Parâmetros como valores de m/z medido, erro de massa (ppm), IDH, fórmula mínima e estrutura proposta para os sinais detectados nos resíduos. ....	69
Tabela 7. Análise por CG-EM das amostras. ....	91
Tabela 8. Teores de substâncias fenólicas expressas em mg EAC/g nos resíduos agroindustriais: vinhaça, torta de filtro e bagaço. ....	101
Tabela 9. Efeitos dos extratos e partições sobre a germinação de <i>Lactuca sativa</i> . ....	103
Tabela 10. Comparação de Cl <sub>50</sub> de <i>L. sativa</i> e <i>I. purpurea</i> . ....	112

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Processo industrial da indústria sucroalcooleira .....	28
Esquema 2. Fermentação alcoólica. ....	29
Esquema 3. Processamento laboratorial da extração e/ou partição da vinhaça. ....	59
Esquema 4. Procedimento laboratorial de extração e/ou partição da Torta de filtro. .	60
Esquema 5. Procedimeno laboratorial de extração e/ou partição do Bagaço. ....	61
Esquema 6. Processo genérico de derivatização (metilação). ....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibração do ácido clorogênico. ....	66
Gráfico 2. Variedade de substâncias presentes nas amostras. ....	72
Gráfico 3. Efeito do extrato e/ou partições da vinhaça sobre o crescimento das radículas de <i>L. sativa</i> .....	106
Gráfico 4. Efeito do extratos e/ou partições dos resíduos sobre o crescimento de hipocótilos de <i>L. sativa</i> .....	106
Gráfico 5. Efeito dos extrato da torta de filtro e bagaço sobre o crescimento das radículas de <i>L. sativa</i> .. .....	107
Gráfico 6. Efeito dos extrato da torta de filtro e bagaço sobre o crescimento de hipocótilos de <i>L. sativa</i> .....	107
Gráfico 7. Efeito das partições diclorometano (A) e acetato de etila (B) sobre o crescimento das raízes de <i>L. sativa</i> .. .....	108
Gráfico 8. Efeito da partição em diclorometano da vinhaça sobre crescimento das raízes <i>I. purpurea</i> .. .....	111
Gráfico 9. Efeito da partição em acetato de etila da vinhaça sobre <i>I. purpurea</i> . ....	111
Gráfico 10. Efeito das misturas das partições em diclorometano e acetato de etila da vinhaça sobre <i>L. sativa</i> .....	116

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Vantagens de bio-herbicidas em relação a herbicidas sintéticos.....	43
---	----

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Dose máxima de Vinhaça.....	35
<b>Equação 2.</b> Porcentagem de germinação de sementes. ....	64
<b>Equação 2.</b> Crescimento de raízes e hipocótilos.....	64

## LISTA DE ABREVIações

AcOEt – Acetato de etila

ADV - Decantado acetonico da vinhaça

BMeOH - Extrato saponificado da torta de filtro com extração líquido-líquido em hexano

BSapoD - Extrato saponificado do bagaço com extração líquido-líquido em diclorometano

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

DIC – Dissociação induzida por colisão

DiCl - Diclorometano

EDV - Decantado etanólico da vinhaça

ESI – Ionização por electrospray (Electrospray ionization)

FT-ICR MS – Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (do inglês, Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry)

F.M – Fórmula molecular

g i.a. ha<sup>-1</sup> – grama do ingrediente ativo por hectare

IDH – índice de deficiência de hidrogênio

Ident- Identificação

M.E - Massa molecular medida

MeOH/KOH – Solução de metanol e hidróxido de potássio na concentração 0.5 M

MS – Espectrometria de Massas (Mass spectrometry)

MS<sup>2</sup> - Espectrometria de massas sequencial (do inglês *Tandem Mass Spectrometry*)

TFAq - Extrato aquoso da vinhaça

TFDiCl - Extrato em diclorometano da torta de filtro

TFEtOH - Extrato etanólico da torta de filtro

TFMeOH - Extrato metanólico da torta de filtro

TFSapoD - Extrato saponificado da torta de filtro com extração líquido-líquido em diclorometano

TFSapoH - Extrato saponificado da torta de filtro com extração líquido-líquido em hexano

VAcOEt - Partição em acetato de etila da vinhaça

VAq - Resíduo aquoso da vinhaça

VBruta - Vinhaça Bruta

VDiCl - Partição em diclorometano da vinhaça

VHex - Partição em hexano da vinhaça

## RESUMO

Os resíduos da agroindústria da cana de açúcar vinhaça, torta de filtro e bagaço são abundantes no Brasil, um país líder na produção de açúcar e álcool. O aproveitamento desse resíduo soluciona problemas relativos ao rejeito e à poluição ambiental. Extratos foram produzidos por maceração com solventes, alguns deles foram submetidos a partições líquido/líquido e outros foram saponificados, resultando inúmeras amostras que foram testadas quanto à atividade fitotóxica e analisadas por CG-EM, por ESI (-) FT-ICR-MS e DIC levando à identificação de 22 substâncias, entre elas dez ácidos graxos e doze compostos fenólicos. Os experimentos de DIC dos íons pseudomoleculares  $[M-H]^-$  327.21796 ( $C_{18}H_{32}O_5$ ) e 329.23355 ( $C_{18}H_{34}O_5$ ) levaram a proposição dos ácidos graxos insaturados poli-hidroxiados, 9,12,13-tri-hidroxi-10,15-octadecadienoico, para o primeiro e dos isômeros 9,12,13-tri-hidroxi-10-octadecenoico/9,10,13 tri-hidroxi-12-octadecenoico para o segundo, os quais não foram, até o momento, descritos em *Saccharum* ssp. No bioensaio de fitotoxicidade em *Lactuca sativa*, as frações mais ativas foram a partição em diclorometano da vinhaça ( $CI_{50}$  =168.4 ppm) e em acetato de etila da vinhaça ( $CI_{50}$  =262.3 ppm). As análises por FT-ICR-MS e CG-EM demonstraram que amostra VDiCl é constituída por uma mistura proporcionalmente semelhante de ácidos graxos e de ácidos fenólicos, já a VAcOEt, é formada em maior proporção por uma mistura de compostos fenólicos. Nos bioensaios com *Ipomoea purpurea* (espécie daninha), a partição em diclorometano da vinhaça também se mostrou mais ativa, inibindo em 52% o crescimento de raízes ( $CI_{50}$  = 344 ppm). Na mesma concentração, a partição em acetato de etila inibiu apenas 25,74% o crescimento de raízes. Sugeriu-se que a interação entre ácidos graxos e compostos fenólicos seja importante para uma maior taxa de inibição e que a presença das oxilipinas (ácidos graxos insaturados poli-hidroxiados) tenha participação importante na fitotoxicidade mais acentuada desta amostra. Este trabalho demonstrou a potencialidade de ácidos graxos e compostos fenólicos presentes nos resíduos agroindustriais quanto à fitotoxicidade, indicando que estes possam ser aproveitados como matérias-primas na elaboração de produtos de inovação para o controle de plantas daninhas, minimizando os riscos que o descarte incorreto possa causar ao meio ambiente.

**Palavras Chave** –*Saccharum* ssp., fitotoxicidade, vinhaça, torta de filtro, bagaço, reaproveitamento de resíduos

## ABSTRACT

The residues of agroindustry from sugar cane vinasse, filter cake and bagasse are abundant in Brazil, a leading country in the production of sugar and alcohol. The use of this waste solves problems related to waste and environmental pollution. Extracts were produced by solvent maceration, some of them were submitted to liquid / liquid partitions and others were saponified, resulting in numerous samples that were tested for phytotoxic activity and analyzed by GC-MS, by ESI (-) FT-ICR-MS and ESI (-) MS / MS leading to the identification of 22 substances, among them ten fatty acids and twelve phenolic compounds. The DIC experiments of the pseudomolecular ions [MH] – 327,21796 (C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>) and 329,23355 (C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>) led to the proposition of the polyhydroxylated unsaturated fatty acids, 9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic, for the first and the isomers 9, 12,13-trihydroxy-10-octadecenoic acid / 9,10,13-trihydroxy-12-octadecenoic acid for the second, which have not been described so far in *Saccharum* ssp. GC-MS analyzes corroborated the chemical profile already observed by the FT-ICR-MS technique. In the phytotoxicity bioassay in *Lactuca sativa*, the most active fractions were the dichloromethane partition of vinasse (IC<sub>50</sub> = 168.4 ppm) and ethyl acetate of vinasse (IC<sub>50</sub> = 262.3 ppm). The FT-ICR-MS and CG-EM analyzes demonstrated that the VDiCl sample consists of a proportionally similar mixture of fatty acids and phenolic acids, whereas VAcOEt is formed in a higher proportion by a mixture of phenolic compounds. In the bioassays with *Ipomoea purpurea* (weed), the dichloromethane partition of vinasse was also more active, inhibiting root growth by 52% (IC 50 = 344 ppm). At the same concentration, the ethyl acetate partition inhibited only 25.74% root growth. It has been suggested that the interaction between fatty acids and phenolic compounds is important for a higher rate of inhibition and that the presence of oxilipins (polyhydroxylated unsaturated fatty acids) is essential for the more marked phytotoxicity of this sample. This work demonstrated the potentiality of fatty acids and phenolic compounds present in the agroindustrial residues regarding phytotoxicity, indicating that these can be used as raw materials in the elaboration of innovative products for the control of weeds, minimizing the risks that the incorrect disposal to the environment.

Keywords - *Saccharum* ssp., phytotoxicity, vinasse, filter cake, bagasse, reuse of residues.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	23
1.1. Taxonomia e origem da cana-de-açúcar .....	24
1.2. Descrição botânica da cana-de-açúcar .....	25
1.3. Importância da cana-de-açúcar no mundo e no Brasil .....	26
1.4. Processamento industrial da cana-de-açúcar .....	28
1.5. Resíduos da indústria sucroalcooleira .....	30
1.5.1. Bagaço .....	30
1.5.2. Vinhaça .....	32
1.5.3. Torta de filtro .....	35
1.6. Alelopatia e compostos alelopáticos .....	37
1.6.1. Alelopatia no controle de plantas daninhas .....	40
1.6.2. Alelopatia em <i>Saccharum</i> ssp. ....	45
1.6.3. Ação alelopática de ácidos graxos .....	49
1.6.4. Ação alelopática de compostos fenólicos .....	51
2. OBJETIVOS .....	55
2.1. Objetivo geral .....	55
2.2. Objetivos específicos .....	55
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	56
3.1. Material .....	56
3.1.1. Resíduos .....	56
3.1.2. Solventes .....	56
3.1.3. Reagentes .....	56
3.1.4. Bioensaio de fitotoxicidade .....	56
3.1.5. Equipamentos .....	57
3.2. Métodos e técnicas .....	58
3.2.1. Preparação das frações e extratos .....	58

3.2.1.1. Vinhaça .....	58
3.2.1.2. Torta de filtro.....	59
3.2.1.3. Bagaço .....	60
3.2.2. ESI (-) FT ICR MS e ESI (-)-MS/MS (DIC).....	61
3.2.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) .....	62
3.2.3.1. Processo de derivatização das amostras .....	62
3.2.4. Bioensaio de atividade fitotóxica .....	63
3.2.4.1. Germinação .....	63
3.2.4.2. Crescimento de raízes e hipocótilos.....	64
3.2.5. Análise estatística dos resultados e determinação de concentração inibitória média (Cl <sub>50</sub> ).....	65
3.2.6. Análises de compostos fenólicos totais .....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
4.1. Análises fitoquímicas dos resíduos .....	67
4.1.1. Análise de ácidos graxos e compostos fenólicos por ESI (-) FT-ICR-MS.....	67
4.1.1.1. Identificação de oxilipinas por ESI (-) MS/MS em <i>Saccharum</i> ssp.....	84
4.1.2. Análise de ácidos graxos e compostos fenólicos por CG-EM .....	89
4.2. Determinação dos teores de fenóis totais das diferentes frações e extratos dos resíduos .....	99
4.3. Bioensaio de fitotoxicidade.....	102
4.3.1. Germinação.....	102
4.3.2. Crescimento de raízes e hipocótilos.....	103
4.3.3. Determinação de Cl <sub>50</sub> em <i>Lactuca sativa</i> .....	108
4.3.4. Bioensaio e determinação de Cl <sub>50</sub> com sementes de <i>Ipomoea purpurea</i> .....	110
4.3.5. Bioensaio com misturas das frações mais ativas .....	115
5. CONCLUSÃO.....	117
6. REFERÊNCIAS.....	118

ANEXOS .....	140
--------------	-----

## 1. INTRODUÇÃO

A Alelopatia é definida como “qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (excluindo animais), incluindo efeitos estimulantes e inibitórios” (MACIAS, 2000). Este fenômeno é um mecanismo ecológico relevante que tem influência na dominação e sucessão de plantas, no qual as interações determinam a sobrevivência da espécie no ambiente (GATTI *et al.* 2004; TAIZ e ZEIGER, 2009). Desde a década de 70, sabe-se que características alelopáticas de plantas poderiam ser exploradas para fins de controle de espécies daninhas nas mais variadas culturas (PUTNAM *et al.* 1983).

As substâncias químicas responsáveis pelo efeito alelopático são liberadas pelas plantas quando expostas a condições que prejudiquem seu desenvolvimento (AMB & AHLUWALIA, 2016; BERTIN *et al.* 2003). Dentre os compostos alelopáticos, destacam-se ácidos fenólicos, terpenos, alcaloides, ácidos graxos de cadeias longas, lactonas e compostos voláteis (XUAN *et al.* 2016). PUTMAN (1988) os chamou de herbicidas da natureza.

Devido aos malefícios causados pelo uso exacerbado de herbicidas sintéticos (PANAGOPOULOS *et al.* 2012; GUPTA, 2017), a utilização de alternativas sustentáveis para o controle de plantas daninhas é essencial na produção agrícola, e a alelopatia ou produtos originários deste fenômeno (bio-herbicidas) são uma opção frente a aplicação de herbicidas sintéticos (HUSSIAN *et al.* 2016). Os compostos alelopáticos podem ser utilizados como herbicidas biodegradáveis ou podem servir como modelos no desenvolvimento de herbicidas de origem natural, pois são considerados menos danosos, devido à sua origem e por possuírem tempo de meia-vida reduzido em comparação aos tradicionais herbicidas sintéticos (DUKE, 2002; QIAN *et al.* 2009).

Através de bioensaios *in vitro* é possível verificar o potencial dos metabólitos secundários isolados ou em misturas quanto à fitotoxicidade (BLUM, 1999; WU *et al.* 2001).

Os trabalhos de Gomes *et al.* (2016), Sampietro *et al.* (2006); Sampietro & Vattuone, 2006a e Sampietro & Vattuone, 2006b avaliaram o potencial fitotóxico de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar). Os resultados mostraram-se positivos em relação à capacidade das biomoléculas, ácidos graxos e compostos fenólicos no controle de plantas daninhas.

A geração de resíduos das indústrias de processamento de cana-de-açúcar no Brasil foi de 671 394 957 t no ano de 2009. A vinhaça contribuiu com um volume de efluente líquido de 604 255 461 m<sup>3</sup> /ano, enquanto produziu-se 201 418 487 t de resíduos sólidos que são formados por bagaço e torta de filtro (PNRS, 2011).

Estabelecer uma maneira adequada de gerenciar os resíduos agroindustriais, vinhaça, torta de filtro e bagaço é um grande desafio para a indústria sucroalcooleira no que tange a seu manuseio e descarte, já que sua composição limita sua utilização e disposição final (GEORGE *et al.* 2010; CARRILHO *et al.* 2016). Com o intuito de agregar valor e diminuir os impactos que podem ser causados pelo seu manejo incorreto, este trabalho realizou um estudo de identificação de ácidos graxos e compostos fenólicos encontrados nos resíduos agroindustriais, bem como avaliou a fitotoxicidade destes frente à planta daninha *Ipomoea purpurea*, que apresenta resistência ao herbicida sintético glifosato (KUESTER *et al.* 2016) e infesta diferentes culturas, causando dificuldades principalmente ao processo de colheita (LORENZI, 2000).

### **1.1. Taxonomia e origem da cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é pertencente ao gênero *Saccharum*, família Poaceae e sua primeira descrição taxonômica ocorreu no ano de 1753, pelo botânico Carolus Linnaceus (HITCHCOCK, 1923). Em seu livro *Species Plantarum*, Linnaeus descreve duas espécies: *Saccharum officinarum* L. e *S. spicatum* L., sendo a última classificada atualmente no gênero *Perotis* (DILLON *et al.* 2007).

O gênero *Saccharum* tem como sinônimos *Saccharophorum* e *Saccharifera*. Em sua descrição inicial existiam de cinco a dez espécies da Ásia e África, as quais estão incluídas *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. edule* e *S. barberi*.

Posteriormente outras espécies, antes alocadas em outros gêneros, foram transferidas para *Saccharum*, são elas: *Erianthus*, *Andropogon*, *Eriochrysis* e *Anthoxanthum* (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.* 2011).

Na classificação taxonômica atual, a cana-de-açúcar é descrita como integrante da família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae, subtribo Saccharinae, gênero *Saccharum* (DANIEL e ROACH, 1987).

São membros do gênero: *Saccharum officinarum*; *Saccharum spontaneum*; *Saccharum sinense*; *Saccharum barberi*; *Saccharum robustum*; *Saccharum edule* (Ásia e África). *Saccharum villosum*; *Saccharum asperum* (América do norte, central e sul) entre outras (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.* 2011).

Acredita-se que a cana-de-açúcar seja cultivada desde a pré-história, e sua origem aconteceu em Melanésia (região da Oceania, que compreende as regiões atuais de ilhas Molucas, Nova Guiné, ilhas Salomão, Vanuatu, Nova Caledônia e Fiji). No período pré-colonial, após sua domesticação, foi largamente cultivada nas áreas de Papua Nova Guiné e Java (CIB, 2009).

A cana-de-açúcar atualmente cultivada é originária dos cruzamentos ocorridos no início do século XX, entre as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, a primeira rica em açúcares e suscetível a doença e, a segunda, pobre em açúcar e mais resistente (DILLON *et al.* 2007; CIB, 2009). O híbrido possui cerca de 80 a 90% de genoma de *S. officinarum* e 10 a 20% de genoma de *S. spontaneum* (PIPERIDIS *et al.* 2010), sendo denominado *Saccharum spp* (LANDEL e BRESSIANI, 2010).

## 1.2. Descrição botânica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta herbácea, com raízes permanentes e adventícias, responsáveis pela brotação e suporte das plantas até a formação das raízes permanentes. O caule ou colmo consiste em nós intercalados com internós, cilíndricos e um pouco mais grossos nos internós, carnosos e com epiderme lenhosa de coloração amarelada, verde ou violácea. As folhas são alternadas e presas nos colmos, planares, lineares, com ápice agudo, ásperas, com nervura central saliente

e bainha espinescente. A inflorescência da cana-de açúcar é ramificada, em forma de cone e panícula com uma haste principal, que é a continuação do último entrenó do colmo, responsável pela reprodução, e é denominada espiguiilha, cada espiguiilha é composta por até 50 flores. As flores consistem em duas lodículas, androceu e ginoceu. Os grãos de pólen são esféricos quando férteis e prismáticos quando estéreis. O fruto da cana-de-açúcar é pequeno, do tipo cariopse ovoide, seco e não pode ser separado da semente (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; VIDAL e VIDAL, 2003).



Figura 1. *Saccharum officinarum*.

Fonte: The Herbarium of the Manchester Museum. Disponível em: <https://herbologymanchester.wordpress.com/tag/saccharum-officinarum/>

### 1.3. Importância da cana-de-açúcar no mundo e no Brasil

A cana-de-açúcar é largamente cultivada em todo mundo, sendo considerada uma das culturas mais importantes economicamente (DEL RÍO *et al.* 2015), apresentando grande interesse tecnológico e industrial devido ao elevado potencial energético e por ser totalmente renovável (HAHN-HAGERDAL *et al.* 2006).

No ano de 2014, a área mundial cultivada foi de 27 124,7 mil hectares, enquanto a produção de cana-de-açúcar alcançou 1 884,2 milhões de toneladas com rendimento por hectare de 69,4 toneladas, os países com maiores produções foram Brasil, seguido da Índia e China (FAO, 2017).

Em 2013, os rendimentos financeiros do cultivo de cana-de-açúcar, e da indústria sucroalcooleira chegaram a US\$ 81,51 bilhões (FAO, 2017).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil entre 1510-1532, nas capitânicas-hereditárias de São Vicente e do Nordeste (CIB, 2009). Mas foi o programa Proálcool criado em 1975 pelo governo brasileiro que contribuiu para a expansão da cultura de cana-de-açúcar no país, pois tinha o intuito de diminuir a dependência das importações de petróleo (KOHLHEPP, 2010). Foram criadas linhas de crédito para instalação e ampliação de destilarias de álcool vinculadas a usinas de açúcar e também para a construção de novas destilarias; a resposta a estes incentivos foi o rápido crescimento da produção de álcool, atingindo mais de 50% em 5 anos (SZMRECSÁNYI E MOREIRA, 1991; DEMATTÊ *et al.* 2004).

No Brasil, a área que deverá ser colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2017/18 é de 8 838,5 mil hectares, produzindo 647,6 milhões de toneladas. A estimativa é que a produção do país tenha um decréscimo de 1,5% em relação à safra passada (CONAB, 2017).

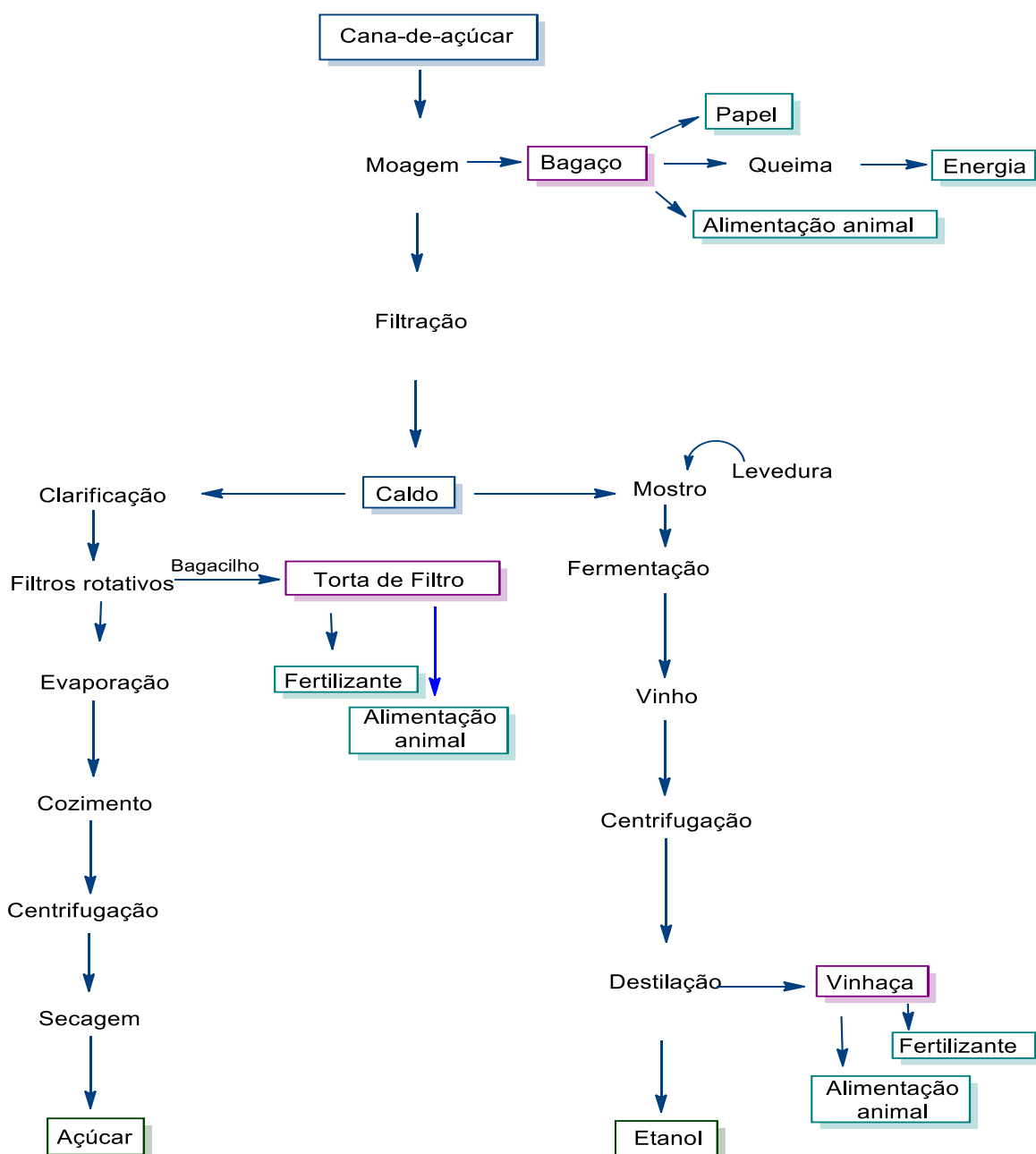
Em termos econômicos, em 2013, o rendimento da safra brasileira de cana-de-açúcar atingiu os US\$ 22 941,1 bilhões (FAO, 2017).

A estimativa é de que 52% da safra 2017/18 de cana-de-açúcar no Brasil seja destinada a produção de etanol, atingindo a marca de 2 780 bilhões de litros e 47% para a produção de açúcar, alcançando 38 701,9 mil toneladas, mantendo o país como líder na produção mundial deste manufaturado. A partir da cana-de-açúcar também são produzidos bagaço para alimentação animal, cachaça, rapadura, entre outros produtos (CONAB, 2017).

Em 2016, as exportações brasileiras do setor sucroalcooleiro (açúcar e álcool) geraram de receita US\$ 7 bilhões, classificando este setor como terceiro item mais exportado pelo agronegócio do país (SECEX, 2017).

## 1.4. Processamento industrial da cana-de-açúcar

O processo industrial da cana-de-açúcar tem como objetivo produzir etanol e açúcar. O caldo da cana é purificado, concentrado e cristalizado para produzir açúcar, ou fermentado e destilado para produzir etanol (Esquema 1) (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.* 2011).

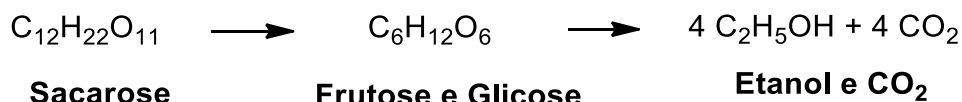


Esquema 1. Processo industrial da indústria sucroalcooleira (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011, modificado pelo autor).

O açúcar é obtido diretamente da cana-de-açúcar, sendo constituído basicamente de sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) e pequena quantidade de impurezas. Na etapa de clarificação do caldo da cana, a maior parte das impurezas é eliminada; no Brasil, comumente, empregam-se dois métodos físicos, a calagem ou defecação simples e sulfo-defecação (KOBLOITZ, 1988).

A defecação simples consiste da adição de hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$  ao caldo da cana, e posterior aquecimento, levando à formação de precipitado floculoso, que absorve e carrega a maior parte do material suspenso no caldo (HONIG, 1953; HUGGOT, 1977). Este tipo de clarificação produz açúcares com coloração mais escura como mascavo e demerara, com teor mínimo de sacarose, respectivamente de 90 e 96% (BRASIL, 2005). Na sulfo-defecação, há um procedimento preliminar à calagem, chamado de sulfitação, que é o contato do caldo com  $SO_2$ ; na neutralização do caldo com hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$ , ocorre a formação do composto sulfito de cálcio ( $CaSO_3$ ) que absorve as impurezas e sujidades, promovendo a produção de um açúcar com elevadíssimo teor de sacarose, acima de 99,9% e coloração clara, denominado açúcar cristal branco (CAMARGO, 1990; BRASIL, 2005).

O etanol é um líquido inflamável, produzido pela fermentação e posterior destilação do caldo da cana. Na fermentação é utilizada a levedura chamada *Saccharomyces cerevisiae*, que através da fermentação alcoólica, transforma a sacarose em álcool; produzem-se quatro mols de álcool e quatro mols de gás carbônico para cada mol de sacarose (Esquema 2).



Esquema 2. Fermentação alcoólica.

Normalmente são produzidos etanol hidratado combustível (EHC) e etanol anidro combustível (EAC). O EHC é comercializável nos postos de abastecimento veicular e os parâmetros exigidos são: densidade de 807,6-811,0  $Kg/m^3$  a  $20^\circ C$ , teor

alcoólico 95,1-96,0° INPM, massa alcoólica 92,5-93,8%, mínimo de etanol de 94,5% e máximo de teor de água de 4,9%, o EAC é misturado à gasolina em um teor máximo de 20%, para aumentar a octanagem do combustível e precisa atender aos seguintes parâmetros: densidade máxima 791,5 Kg/m<sup>3</sup> a 20°C, teor alcoólico mínimo de 99,6%, com massa mínima de 99,3%, teor mínimo de etanol de 98% e máximo de água de 0,4% (BRASIL, 2015).

Como subprodutos da indústria sucroalcooleira têm-se vinhaça, também conhecido como vinhoto ou restilo, obtida no processo de destilação do etanol, torta de filtro, proveniente da etapa de clarificação do caldo de cana para a produção de açúcar e bagaço advindo da moagem da cana-de-açúcar (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.* 2011).

O bagaço é utilizado como combustível em caldeiras, nos sistemas de cogeração, onde o vapor obtido é empregado em outros processos industriais ou usado para a produção de energia elétrica (INNOCENTE, 2011). A torta de filtro é utilizada como corretor da acidez do solo e para recuperação da deficiência de nutrientes nos solos (FRAVET *et al.* 2010). A vinhaça é empregada na fertirrigação, processo no qual ocorrem concomitantemente fertilização e irrigação (VIEIRA, 1986).

A geração de resíduos das indústrias de processamento de cana-de-açúcar no Brasil foi 671 394 957 t no ano de 2009. Vinhaça contribuiu com um volume de efluente líquido de 604 255 461 m<sup>3</sup>/ano enquanto produziu-se 201 418 487 t de resíduos sólidos que são formados por bagaço e torta de filtro (PNRS, 2011).

## **1.5. Resíduos da indústria sucroalcooleira**

### **1.5.1. Bagaço**

Após a moagem da cana-de-açúcar e a remoção do caldo, os resíduos fibrosos restantes são chamados de bagaço (BAHURUDEEN *et al.* 2015), o qual é um material lignocelulósico (SOCCOL *et al.* 2010). A composição química do bagaço varia conforme alguns fatores: genótipo de cana-de-açúcar, solo de plantio, técnica de usada no plantio e manuseio. Na tabela 1, abaixo, tem-se a composição química

média do bagaço de cana-de-açúcar:

**Tabela 1. Componentes do bagaço da cana-de-açúcar.**

<b>Composição Química média</b>	<b>%</b>
Carbono	39,7 - 49,0
Oxigênio	40,0 - 46,0
Hidrogênio	5,5 - 7,4
Nitrogênio e Cinzas	0 - 0,3

Fonte: PERES (1999).

As propriedades físico-químicas, assim como a composição química, variam conforme a variedade da cana-de-açúcar e outras condições (solo, manuseio, clima, entre outros). A tabela 2 apresenta os teores médios de algumas propriedades:

**Tabela 2. Propriedades químicas do bagaço da cana-de-açúcar.**

<b>Propriedades Físico-Químicas</b>	<b>%</b>
Umidade	50
Fibra	46
Brix (Sacarose)	2
Impurezas minerais	2

Fonte: PERES (1999).

A fibra ou biomassa lignocelulósica é constituída basicamente de celulose, hemicelulose e lignina (BALAT, 2011). Seus teores médios são: celulose – 45%, hemicelulose – 25,8% e lignina – 19,1% (CANILHA *et al.* 2011).

Para cada tonelada de cana-de-açúcar moída, são gerados de 240-280 kg de bagaço, correspondendo a cerca de 30% do total em massa (SILVA, 2007).

A geração de bagaço estimada para a safra 2017/18 no Brasil será de 194,3 milhões de toneladas (CONAB, 2017); essa biomassa é normalmente queimada em

caldeiras, para geração de energia elétrica (TEIXEIRAS *et al.* 2014). A eletricidade gerada tornou as usinas sucroalcooleiras autossuficientes em energia térmica, elétrica e mecânica, e os excedentes podem ser comercializados (IPEA, 2010).

As cinzas do bagaço da cana-de-açúcar, restante do processo de queima, rica em dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ), com presença de nutrientes essenciais [exceto nitrogênio (N)] e alguns metais como, cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg), etc (TEIXEIRA *et al.* 2014; SILVA *et al.* 2014) são usadas como adubo ou corretor de solo no cultivo da cana-de-açúcar (BRUNELLI e PISANI Jr. 2006) e como material cimentício complementar, principalmente em países onde existe demanda baixa de materiais tradicionalmente usados (KURTIS, 2015).

Apesar da maior parte do bagaço ser utilizado na geração de energia elétrica, ele é considerado como potencial matéria-prima para a agroindústria brasileira (PITARELO, 2007), pois apresenta elevada quantidade de carboidratos e produção em larga escala (RABELO, 2011), outras possibilidades de utilização estão ganhando destaque, como o uso do material na produção de etanol através da hidrólise ácida ou enzimática (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.* 2011), na produção de papel e fabricação de produto químico furfural (GEORGE *et al.* 2010).

### **1.5.2. Vinhaça**

A vinhaça é um efluente ácido, proveniente do processo de destilação do álcool, de coloração castanha, e elevado teor de compostos orgânicos. Cerca de 9-14 litros de vinhaça são produzidos para cada litro de etanol destilado (ESPAÑA-GAMBOA *et al.* 2011).

Para a safra brasileira de 2017/18, a estimativa é que sejam produzidos cerca de 343 milhões de litros de vinhaça (CONAB, 2017). A projeção mundial para o ano de 2023 é de que sejam produzidos aproximadamente 6 trilhões de litros deste material, sendo o Brasil responsável por 31%, ficando atrás apenas dos Estados Unidos com 41% da produção (CARRILHO *et al.* 2016).

A vinhaça é uma mistura complexa de água (93%) e sólidos que são aproximadamente 7%, onde estão compreendidos substâncias inorgânicas e orgânicas (PANT e ADHOLEYA, 2007).

A composição química da vinhaça varia de acordo com o genótipo da cana-de-açúcar da qual foi produzida e também condições de plantio e manuseio (CARRILHO *et al.* 2016). Na tabela 3 consta a composição média inorgânica da vinhaça obtida a partir de três mostos diferentes, enquanto a tabela 4 descreve a composição orgânica média de uma vinhaça com teor de sacarose de 68° Brix:

**Tabela 3. Composição inorgânica média da vinhaça.**

Parâmetros	Melado	Caldo	Melado e Caldo misturados
pH	4,2 - 5,0	3,7- 4,6	4,4 - 4,6
Temperatura (°C)	80 – 100	80 - 100	80 - 100
DBO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	25 000	6000 – 16.500	18 800
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	65 000	15 000 – 33 000	45 000
Total de sólidos (mg L <sup>-1</sup> )	81 500	23 7000	52 7000
Sólidos voláteis (mg L <sup>-1</sup> )	60 000	20 000	40 000
Nitrogênio (mg N L <sup>-1</sup> )	450 – 1610	150 -700	480 - 710
Fósforo (mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> L <sup>-1</sup> )	100 – 290	10 - 210	9 - 200
Potássio (mg K <sub>2</sub> O L <sup>-1</sup> )	3 740 – 7 830	1 200 - 2100	3 340 – 4 000
Cálcio (mg CaO L-1)	450 – 5180	130 - 1540	1 330 – 4 570
Magnésio (mg MgO L <sup>-1</sup> )	420 – 1520	200 – 490	580 - 700
Sulfato (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L-1)	6 400	600 - 760	3 700 – 3 730
Carbono (mg C L <sup>-1</sup> )	11 200 – 22 900	5 700 – 13 400	8 700 – 12 100
Proporção C/N	16 – 16,27	19,7 – 21,07	16,4 – 16,43
Matéria orgânica (mg L <sup>-1</sup> )	63 400	19 500	3 800

Fonte: Carrilho *et al.* 2016 (Modificado pelo autor)

**Tabela 4. Composição orgânica Vinhaça (68.5° Brix)**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Álcool	%p/p
Glicerol	2,70
3-Metoxi-4-hidroxifenil-glicerol	5,4
Sorbitol	1,40
<b>Ácidos orgânicos</b>	<b>%p/p</b>
Ácido piroglutâmico	16,5
Ácido itacônico	9,3
Ácido fumárico	9,3
p-hidroxi-benzóico	4,8
Ácido quínico	0,70
Ácido aconítico	1,80
<b>Açúcares</b>	<b>% p/p</b>
Glicose + Frutose	1,30
Sacarose	0,2

Fonte: Carrilho *et al.* 2016 (Modificado pelo autor).

Devido à elevada taxa de DBO, DQO e sólidos totais, presença de metais traços e concentrações altas de nutrientes como potássio (K) e nitrogênio (N) e outras características, a vinhaça é considerada um resíduo altamente poluente, sendo cerca de 100 vezes mais contaminante que o esgoto doméstico (FREIRE e CORTEZ, 2000; SOLER DA SILVA *et al.* 2013), representa um potencial agente poluidor caso seja lançado sem tratamento prévio em corpos d'água ou rios (APARICIO *et al.* 2017), já que pode provocar a produção primária em ecossistemas aquáticos e favorecendo a eutrofização (MARTINELLI e FILOSO, 2008).

As portarias do extinto Ministério do Interior nº 323 de 1978 e nº 158, de 03 de 1980, determinam a proibição do lançamento direto e indireto da vinhaça em quaisquer corpos hídricos pelas destilarias de álcool instaladas ou que vierem a ser instaladas no país (BRASIL, 1978; BRASIL, 1980), enquanto o nº 124 de 1980 dispõe sobre o armazenamento de substâncias capazes de causar poluição hídrica (BRASIL, 1980).

Embora seja um potencial agente poluidor, a vinhaça é largamente utilizada na agricultura da cana-de-açúcar como fertilizante devido aos níveis consideráveis de nutrientes como, cálcio (Ca), potássio (K) e nitrogênio (N) (PRASAD *et al.* 2008).

Caso seja utilizada de forma indiscriminada e sem cuidados necessários, pode acarretar em contaminação de solos e águas subterrâneas (CARRILHO *et al.* 2016).

A Companhia ambiental do Estado de São Paulo estabeleceu uma norma técnica que determina critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação no solo da vinhaça. Sendo que a dosagem máxima permitida para ser aplicada em culturas de cana-de-açúcar, determinada pela equação 1, onde são levados em consideração os seguintes parâmetros: capacidade de troca catiônica (CTC), concentração de potássio do solo (ks), concentração de potássio na vinhaça (kvi) (CETESB, 2015).

$$\frac{m^3 \text{ da Vinhaça}}{\text{hectares}} = \frac{[(0,05 \times \text{CTC} - \text{ks}) \times 3744 + 185]}{\text{Kvi}}$$

**Equação 1 – Dose máxima de Vinhaça**

**Fonte: CETESB, 2015.**

Além da utilização como fertilizante, as alternativas de emprego em larga escala da vinhaça são reciclagem com fermentação e aerobiose, produção de leveduras e alimento para animais e também digestão anaeróbica (LAIME *et al.* 2011).

### **1.5.3. Torta de filtro**

A torta de filtro é um resíduo sólido formado por impurezas em suspensão e/ou coaguladas, também denominado lodo de decantação, a qual é produzida a partir da adição de hidróxido de cálcio e enxofre na etapa de clarificação do caldo da cana na produção de açúcar, e bagacilho seco (8-14 mesh), adicionado às impurezas da clarificação, para obter uma consistência adequada para passagem na filtração a vácuo, onde a sacarose remanescente é recuperada (BAIKOM, 2013).

Possui coloração escura, estrutura amorfa e consistência esponjosa (BASANTA, 2007).

São produzidos 30-50 kg de torta de filtro para cada tonelada de cana-de-açúcar colhida, o que representa aproximadamente 4% do total em massa (PIPPO *et al.*, 2007); para a safra 2017/18 brasileira serão produzidos cerca de 25,9 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

A torta de filtro possui elevada umidade (70-80%), 10-14% de ceras, óleos e resinas, 12-15% de proteínas, 10-14% de sacarose e carboidratos e nutrientes como fósforo (P), potássio (K), nitrogênio (N) e cálcio (Ca) e, geralmente, é utilizada como fertilizante na cultura da cana-de-açúcar (YADAV e SOLOMON, 2006; GEORGE *et al.* 2010; KUMAR *et al.* 2010).

A composição química da torta de filtro é variável e depende do genótipo da cana-de-açúcar de origem, sua maturação, solo no qual é plantada, processo de clarificação do caldo, entre outros fatores (BUSATO, 2008; ALMEIDA JÚNIOR *et al.* 2011; REBELATO *et al.* 2013). Os valores médios de alguns parâmetros químicos estão descritos na tabela 5 abaixo:

**Tabela 5. Composição química da torta de filtro.**

<b>Parâmetros</b>	<b>%</b>
pH	7,7
Cinzas	52,0
Matéria orgânica	48,0
Nitrogênio total	1,8
Relação C/N	14,0
Fósforo total	0,96
Potássio total	0,39
Cálcio total	7,1
Magnésio total	0,40
<b>Metais</b>	<b>mg kg<sup>-1</sup></b>
Cobre (Cu)	1,9
Zinco (Zn)	51
Manganês (Mn)	257
Ferro (Fe)	803

Fonte: Meunchang *et al.* 2005

Devido à elevada quantidade de matéria orgânica e DBO de 55 kg/m<sup>3</sup> (em 5 dias), a torta de filtro possui elevado potencial poluente de recursos hídricos (BARZAGA *et al.* 2004; REBELATO *et al.* 2013); sua destinação e aplicação são regidas pela Lei n° 12.305/2010, que trata da destinação de resíduos sólidos e resolução CONAMA 313/2002, que dispõe sobre o inventário nacional de resíduos sólidos industriais.

Os benefícios da aplicação da torta de filtro são o fornecimento de matéria orgânica e nutrientes (PENNATTI e BONI, 1989) e correção da acidez do solo (PRASAD, 1974 e 1976). Embora forneça nutrientes importantes ao desenvolvimento da planta, não é capaz de suprir todas as necessidades nutricionais, sendo necessário que concomitantemente adicionem-se outros tipos de fertilizantes (PASSOS *et al.* 2013).

Estudos apontam que solos tratados com torta de filtro aumentaram a concentração de metais pesados, como ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e cobre (Cu), já que o resíduo possui quantidades expressivas destes metais (CERRI *et al.* 1988), o que pode causar contaminação do solo e lençóis freáticos, caso não seja absorvido pelas plantas (SILVA *et al.* 2007).

A utilização da torta de filtro em outras aplicações vem surgindo como possibilidade, a saber: como componente do cimento *Portland* (MAKUL e SUA-IAM, 2016), produção de metano (CONIL, 2010), combustível para caldeiras (GEORGE *et al.* 2010), obtenção de cera (BASANTA, 2007) e produção de biodiesel (CASAS *et al.* 2015).

## 1.6. Alelopatia e compostos alelopáticos

A capacidade de uma determinada espécie de planta influenciar direta ou indiretamente o desenvolvimento de plantas vizinhas é documentada desde a antiguidade; o registro mais antigo desta ação é de Theophrastus (300 A.C), que observou os efeitos negativos de *Cicer arietinum* L. (grão de bico) sobre ervas daninhas (RICE, 1984). Esse fenômeno foi denominado alelopatia (do grego Allelon = mútuo, pathos = prejuízo), termo atribuído pelo fisiologista vegetal Hans Molisch no ano de 1937, em seu livro “Der Einfluss einer Pflanze auf die andere, Allelopathie”, embora o conceito seja conhecido e entendido há cerca de dois mil

anos (WILLIS, 2007). Ao longo de cinquenta anos surgiram variações no uso e na definição deste termo (WILLIS, 1994).

Molisch definiu o fenômeno alelopatia como “todos os efeitos que direta ou indiretamente resultam em substâncias bioquímicas transferidas de uma planta para outra” (MOLISCH, 1937).

Em 1968, o sub-comitê Internacional do programa de Biologia (IBP) em conjunto com sub-comitê de fisiologia ambiental, da Divisão de Biologia e Agricultura sugeriram que fosse incorporado ao significado de alelopatia, as interações de estimulação e não só as interações de inibição como era comumente interpretada. Também foi adotado por essas instituições que a alelopatia e os compostos responsáveis por promover esse fenômeno são originários das plantas e que causariam efeitos em outras plantas e animais (ENVIRONMENTAL PHYSIOLOGY SUBCOMMITTEE, 1971).

No ano de 1984, Rice redefiniu o termo alelopatia para “qualquer efeito benéfico ou prejudicial, direto ou indireto de plantas, inclui-se microrganismo, sobre outras plantas ou microrganismos, através da produção de compostos químicos que são liberados para o meio ambiente; os compostos químicos são chamados de compostos alelopáticos” (RICE, 1984).

A definição atualmente mais aceita para alelopatia foi atribuída pela Sociedade Internacional de Alelopatia criada em 1996, que define como “qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (excluindo animais), incluindo efeitos positivos e negativos” (MACÍAS, 2000).

O mecanismo alelopático pode ser autotóxico ou heterotóxico. A autotoxicidade refere-se ao mecanismo intraespecífico, onde uma planta libera substâncias fitotóxicas, que impedem ou dificultam o desenvolvimento de plantas da mesma espécie, enquanto a heterotoxicidade corresponde a liberação de substâncias tóxicas que inibem desenvolvimento de plantas de outras espécies (MILLER, 1996).

Compostos alelopáticos provêm do metabolismo secundário, o qual está relacionado à interação do organismo com o meio ambiente, incluindo defesa, sobrevivência e proteção (DEWICK, 2009).

Os metabólitos secundários, no processo evolutivo de plantas com microrganismos, algas e vírus, criaram benefícios/vantagens sobre patógenos, insetos, entre outros, inibindo a ação destes ou estimulando o desenvolvimento da planta (WALLER, 1999). Podem ser encontrados em todas as partes das plantas, incluindo folhas, caule, raízes e frutos, e em diferentes concentrações (WEIR *et al.* 2004); sua liberação pode ocorrer por vários mecanismos, são eles: lixiviação e volatilização de compostos presentes em folhas, exsudação radicular ou difusão e transformação por microrganismos (AMB e AHLUWALIA, 2016; GOMES *et al.* 2017).

Os compostos alelopáticos podem atuar em diferentes processos eco-fisiológicos das plantas, são eles: germinação, crescimento, desenvolvimento, reprodução e distribuição (RICE, 1984; AMB e AHLUWALIA, 2016).

A produção de substâncias alelopáticas está condicionada a certos fatores, como radiação ultravioleta, calor, pragas, doenças, umidade e uso de herbicidas; o estresse ambiental promove uma maior produção dessas substâncias (EINHELLIG, 1996).

O mecanismo de ação de substâncias alelopáticas pode ser direto ou indireto. O primeiro ocorre quando o composto alelopático interfere diretamente no metabolismo vegetal, e o segundo, quando a substância, modifica inicialmente certas propriedades químicas do solo (FERREIRA e AQUILA, 2000). Os compostos alelopáticos podem afetar as estruturas e ultraestruturas celulares, síntese de pigmentos e proteínas, relações hídricas e condução de seiva, atividade enzimática, concentração e balanço hormonal, permeabilidade de membranas celulares modificando a absorção de minerais, movimentação dos estômatos interferindo na fotossíntese e alteração de RNA e DNA (RIZVI e RIZVI, 1992).

Até o ano de 1995, haviam sido identificados cerca de 300 metabólitos secundários, de diversas classes químicas, em plantas e microrganismos com atividade alelopática (EINHELLIG, 1995). Eles variam de compostos muito polares até

hidrofóbicos (VYVYAN, 2002); a primeira classificação os dividiu em 14 classes, segundo a sua origem biossintética (MACÍAS *et al.* 2007): ácidos graxos, fenóis, flavonoides, terpenoides, alcaloides, poliacetilenos, peptídeos, cumarinas, taninos, entre outros (RICE, 1984). A maioria deles está contida nas classes ácidos fenólicos, terpenos, alcaloides, ácidos graxos de cadeias longas, flavonoides, lactonas e compostos voláteis (XUAN *et al.* 2016).

A alelopatia é um relevante mecanismo ecológico que tem influência na dominação e sucessão de plantas, onde as interações determinam a sobrevivência da espécie no ambiente. A ação de estimular ou inibir é resultado de interferências isoladas ou coletivas nos processos fisiológicos vitais das espécies, desta forma, a alelopatia é considerada um recurso no desenvolvimento de herbicidas naturais (GATTI *et al.* 2004; TAIZ e ZEIGER, 2009). PUTMAN (1988) os chamou de herbicidas da natureza.

Os estudos de alelopatia geralmente iniciam com o reconhecimento da fitotoxicidade da planta em laboratório, com teste intitulado bioensaio, onde são efetuados sob condições controladas em câmaras de germinação, tais como temperatura e concentração definida de extratos da espécie vegetal (WU *et al.* 2001). A fitotoxicidade é mensurada pelo atraso ou inibição da germinação de sementes e/ou inibição do desenvolvimento das plântulas, e também por efeitos adversos causados por substâncias específicas (BAUMGARTEN e SPIEGEL, 2004). Os bioensaios de fitotoxicidade consistem geralmente em monitorar a germinação de sementes e/ou crescimento de hipocótilos e raízes de espécies vegetais sensíveis, na presença de metabólitos secundários da planta em estudo (BLUM, 1999; BLUM, 2004). O bioensaio onde se utilizam sementes de *Lactuca sativa* é reconhecido como estatístico e de toxicidade aguda (ANDRADE *et al.* 2010).

### **1.6.1. Alelopatia no controle de plantas daninhas**

As plantas daninhas são consideradas um dos maiores problemas na produção agrícola, pois interferem na qualidade e no rendimento das culturas (GAZZIERO *et al.* 2011; KRAEHMER e BAUR, 2013). As perdas em produtividade são de 30 a 40%

em média, dependendo do tipo de cultura, extensão na cultura e espécie que promove a infestação (VOLL *et al.* 2002).

Em termos econômicos, as perdas mundiais com plantas daninhas atingem a marca dos 100 bilhões de dólares por ano (APPLEBY *et al.* 2000).

Os mecanismos usados pelas plantas daninhas para limitar a evolução da cultura principal envolvem a competição por recursos como água, luz e nutrientes, e interações alelopáticas, onde o vegetal inibe o desenvolvimento de outra espécie pela liberação de metabólitos secundários (CHAUHAN e GILL, 2014; SWANTON *et al.* 2015).

A fim de minimizar as perdas de qualidade, rendimento e financeiras provocadas pelas plantas daninhas, diferentes formas de manejo são utilizadas, entre elas: remoção manual das plantas infestantes, que é um processo dispendioso, e se tornou inviável economicamente, remoção mecânica, muito usada em países em desenvolvimento, e utilização de herbicidas, que é atualmente o método mais empregado, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, já que tem custo relativamente baixo, alta eficiência, e baixo emprego de mão de obra (CHAUHAN e GILL, 2014).

Estima-se que anualmente sejam comercializados 27 bilhões de dólares com herbicidas em todo mundo (KRAEHMER, 2012).

Embora os benefícios advindos do uso de herbicidas sejam inegáveis (MORAES e REZENDE, 1998), a utilização maciça dos mesmos tem sido desestimulada, devido aos seus efeitos residuais, extensos períodos de persistência em solo, toxicidade não seletiva. Na última década, houve aumento de preocupação em relação aos danos causados ao meio ambiente e à saúde humana (HUSSIAN *et al.* 2016).

Atualmente existem cerca de 270 herbicidas e apenas 17 mecanismos de ação, sendo metade deles inseridos em três classes: inibidores de fotossíntese em *fotosistema II*, inibidores de acetolactato sintase (ALS) e inibição de protoporfirinogênio sintase (PPO) (MACÍAS *et al.* 2007).

A utilização extensiva de herbicidas com mecanismo de ação semelhante provocou o desenvolvimento de biótipos resistentes, que infestam as culturas por todo mundo (BAIWA *et al.* 2015). Estima-se que existam 250 biótipos resistentes pertencentes a 154 espécies (HUSSIAN *et al.* 2016), o incremento financeiro causado pela resistência de plantas daninhas a herbicidas é de cerca de 55 dólares por hectares (LLEWELLYN *et al.* 2016).

No ano de 2014, foram registrados 2314 casos de intoxicação por agrotóxicos e 58 óbitos (SINITOX, 2014).

Os danos à saúde humana compreendem má formação congênita de fetos, infertilidade, abortos espontâneos, problemas cardíacos, lábio leporino, e em animais domésticos e selvagens provoca anomalias genéticas e variações esqueléticas (GUPTA, 2017).

A acumulação no solo acarreta em poluição difusa agrícola, já que os herbicidas têm baixa afinidade com o solo, e são lixiviados para ambientes aquáticos (PANAGOPOULOS *et al.* 2012).

A contaminação de corpos hídricos, em longo prazo, promove a mudança na estrutura da comunidade de microalgas (MAGNUSSON *et al.* 2012), provoca a diminuição da fecundidade e fotossíntese em corais, e ainda, a mortalidade de colônias (BRODIE *et al.* 2012).

Dessa forma, a utilização de alternativas sustentáveis no controle de plantas daninhas é essencial para a produção agrícola, e a alelopatia ou produtos originários deste fenômeno (bio-herbicidas) são uma opção frente ao uso de herbicidas sintéticos (HUSSIAN *et al.* 2016).

Compostos alelopáticos podem ser utilizados como herbicidas biodegradáveis, já que são considerados menos danosos ao meio ambiente, por terem origem natural e tempo de meia-vida reduzido, em comparação aos tradicionais herbicidas sintéticos (DUKE, 2000; QIAN *et al.* 2009). Desde a década de 70 reconhecia-se que características alelopáticas de plantas poderiam ser exploradas para fins de controle de plantas daninhas nas mais variadas culturas (PUTNAM *et al.* 1983).

As vantagens dos bio-herbicidas em relação aos herbicidas sintéticos estão presentes no quadro 1 abaixo:

<b>Herbicidas sintéticos</b>	<b>Bio-herbicidas</b>
Matam plantas	Suprimem o crescimento
Toxicidade não seletiva	Não possuem ameaça tóxica
Perigoso à saúde humana	Não são perigosos à saúde
Alguns não são biodegradáveis	Biodegradáveis
Causam poluição	Não prejudiciais ao meio ambiente
Promovem resistência genética	Não promovem o desenvolvimento de resistência
Impactos ruins ao consórcio	Promovem novo sistema de consórcio

**Quadro 1. Vantagens de bio-herbicidas em relação a herbicidas sintéticos.**

**Fonte: Hussian et al. 2016**

A ação de substâncias alelopáticas ou substâncias naturais com potencial herbicida são menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana comparados aos herbicidas sintéticos (TUR et al. 2010). Normalmente os mecanismos de ação dos compostos alelopáticos difere dos herbicidas comercializados, e podem ser usados como base para produção de herbicidas sintéticos (DUKE, et al. 2000; MACÍAS et al. 2007).

Resíduos das culturas de centeio (*Secale cereale*), trigo (*Triticum aestivum*), sorgo (*Sorghum bicolor*) ou cevada (*Hordeum vulgare*) liberam toxinas no solo e induzem a produção de substâncias fitotóxicas por microrganismos capazes de inibir o desenvolvimento de até 95% de plantas daninhas, em um período de eficiência de 60 dias. Esta atividade inibitória é atribuída a ácidos orgânicos, principalmente aconítico (Figura 2), mas não foi descartada a possibilidade de que outras substâncias químicas tivessem alguma relação, seja ela aditiva ou sinérgica (PUTNAM et al. 1983). Posteriormente, diversos experimentos confirmaram que um único composto não seria capaz de afetar o desenvolvimento de uma espécie vegetal, e que esse fenômeno ocorre pela associação de diversos compostos de diferentes classes químicas, que atuam aditivamente ou sinérgicamente (EINHELLIG, 1996; INDERJIT e DUKE, 2003).

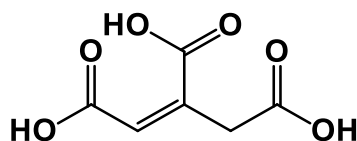


Figura 2. Estrutura do ácido aconítico.

A combinação de métodos de separação e técnicas espectroscópicas permitiu que os compostos alelopáticos fossem isolados, identificados e quantificados (MACÍAS *et al.* 1999).

O óleo essencial de segurelha das montanhas (*Satureja montana* L.) e seu monoterpenóide majoritário carvacrol (Figura 3), com concentração relativa de 56,8%, identificado por CG-EM, apresentaram atividade fitotóxica frente às plantas daninhas *Chenopodium album*, *Portulaca oleracea* e *Echinochloa crus-galli*. Tanto o óleo essencial, quanto a substância carvacrol inibiram em 100% a germinação das três espécies daninhas testadas (ANGELINI *et al.* 2003).

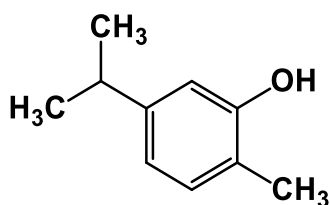


Figura 3. Estrutura do carvacrol.

Extratos aquosos de folhas jovens e maduras de sabão-de-soldado (*Sapindus saponária*) foram testados quanto à germinação de diásporo e crescimento de plântulas capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) e corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*). Os resultados mostraram que os extratos em 10% de concentração foram capazes de inibir o crescimento e germinação das ervas daninhas, já o extrato preparado

com folhas jovens atingiu valores inibitórios próximos ao do herbicida sistêmico seletivo *Nicosulfuron* (Figura 4) (GRISI *et al.* 2012).

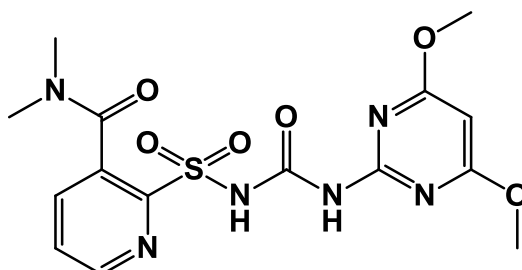


Figura 4. Estrutura do herbicida Nicosulfuron.

O extrato etanólico de folhas de manga (*Mangifera indica* L.) apresentou atividade fitotóxica sobre a planta daninha capim-rabo-de-raposa (*Setaria parviflora*) e o fracionamento cromatográfico guiado por bioensaio permitiu o isolamento e identificação da substância galato de metila (Figura 5), que a uma concentração de 10  $\mu$ M apresentou taxas de inibição 94,4% e 49,3% para germinação e crescimento de hipocótilos, respectivamente (SUZUKI *et al.* 2017).

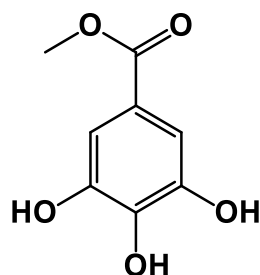


Figura 5. Estrutura do galato de metila.

### 1.6.2. Alelopatia em *Saccharum* ssp.

Os compostos alelopáticos 2,4-di-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (Figura 6a) [DIMBOA] e benzoxazolin-2-ona (Figura 6b) [BOA], isolados e identificados em folhas de cana-de-açúcar, inibiram o crescimento de raízes de lentilha em 50% ou

mais em concentrações de 0,45 mM e 1,25 mM, respectivamente. Testes realizados em trigo mostraram que apenas DIMBOA, promoveu ação inibitória significativa (SINGH *et al.* 2003).

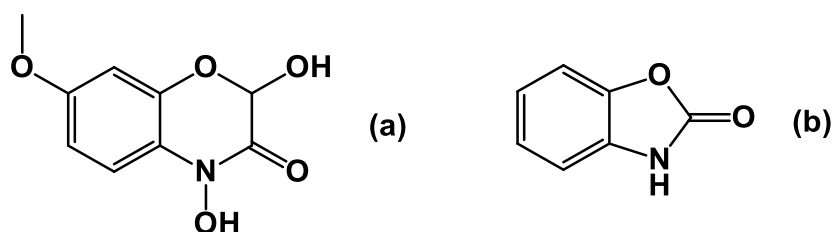


Figura 6. Estrutura do (a) DIMBOA; (b) BOA

A palha da cana-de-açúcar, deixada na superfície do solo após a colheita, promoveu a supressão do crescimento das ervas daninhas, picão-preto e mostarda selvagem. Tal efeito fitotóxico é associado à liberação por lixiviação de compostos fenólicos, o que sugere que tais moléculas orgânicas tenham induzido o aumento da concentração de prolina em resposta ao estresse vegetal (SAMPIETRO e VATTUONE, 2006a).

Testes *in vitro* com lixiviados da palha da cana-de-açúcar em plantas daninhas mostraram maiores inibições de crescimento de raízes em amaranto, mostarda selvagem, *Sida rhombifolia* (Cl<sub>25</sub> 0,10–0,20 mM). O fracionamento guiado por bioensaio dos constituintes lixiviados promoveu o isolamento dos ácidos fenólicos, *trans* e *cis*-ferulico, vanillico e siringico (Figura 7). O ácido vanillico mostrou-se mais fitotóxico, seguido por ferulico e o siringico foi o menos ativo em relação à supressão de crescimento de raízes. Testes mostraram que os ácidos fenólicos isolados promoveram aumento no vazamento de eletrólitos e componentes absorventes de UV, indicando danos à permeabilidade da membrana celular vegetal; observou-se também a redução no índice miótico, que é indicativo de uma depressão do metabolismo energético, inibição da desidrogenase e promoveram efeitos prejudiciais em tecidos radiculares acarretando em inibição da síntese de clorofila (SAMPIETRO *et al.* 2006).

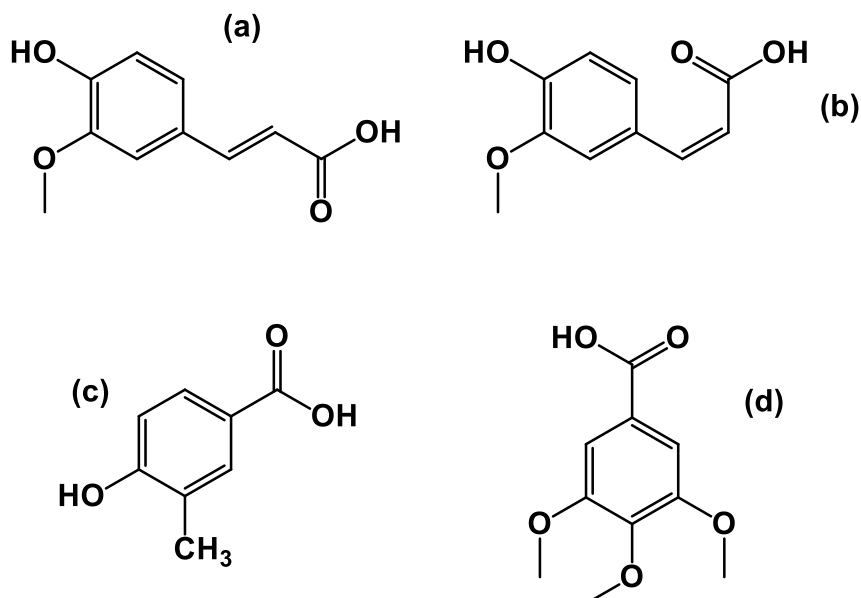


Figura 7. Estrutura do (a) *trans*-ferúlico; (b) *cis*-ferúlico; (c) vanílico e (d) siríngico.

Testes em solo não estéril com padrões de ácidos fenólicos sintéticos, *trans* e *cis*-ferúlico, vanílico e siríngico (Figura 7), em concentrações mais baixas que 19 mg/mL promoveram estimulação no crescimento de raízes, enquanto em concentrações maiores houve um decréscimo no comprimento de raiz para as espécies testadas, indicando relação entre a concentração de fenólicos e supressão do crescimento de raízes. Os testes mostraram que a fitotoxicidade da palha da cana-de-açúcar não pode ser associada apenas aos compostos fenólicos identificados e que fatores intrínsecos ao solo diminuem a atividade fitotóxica dos lixiviados da palha e também dos compostos identificados (SAMPIETRO e VATTUONE, 2006b).

Extrato aquoso de resíduos pós-colheita da cana-de-açúcar como, folhas verdes, entrenós imaturos, folhas velhas e pequenas hastes maduras, constituídos de ácido benzóico, decano, diacetil glicol, ácido metil hexadecanóico e éster de ácido ftálico (Figura 8) promoveram em todas as concentrações (0,1, 1, 10, 25 e 100% de extrato) testadas, inibição da germinação e do crescimento de raiz de planta daninha glória da manhã (*Ipomoea hederacea* Jacq), em uma média de 42% e 8 mm respectivamente, em relação ao controle, enquanto que a concentração de 10% de extrato aumentou em 45% a germinação de brotos de cana-de-açúcar em relação ao controle. Concentrações mais elevadas de extrato resultaram em autotoxicidade,

promovendo atraso no início do desenvolvimento foliar. A fitotoxicidade dos extratos foi atribuída ao ácido benzóico (VIATOR *et al.* 2006).

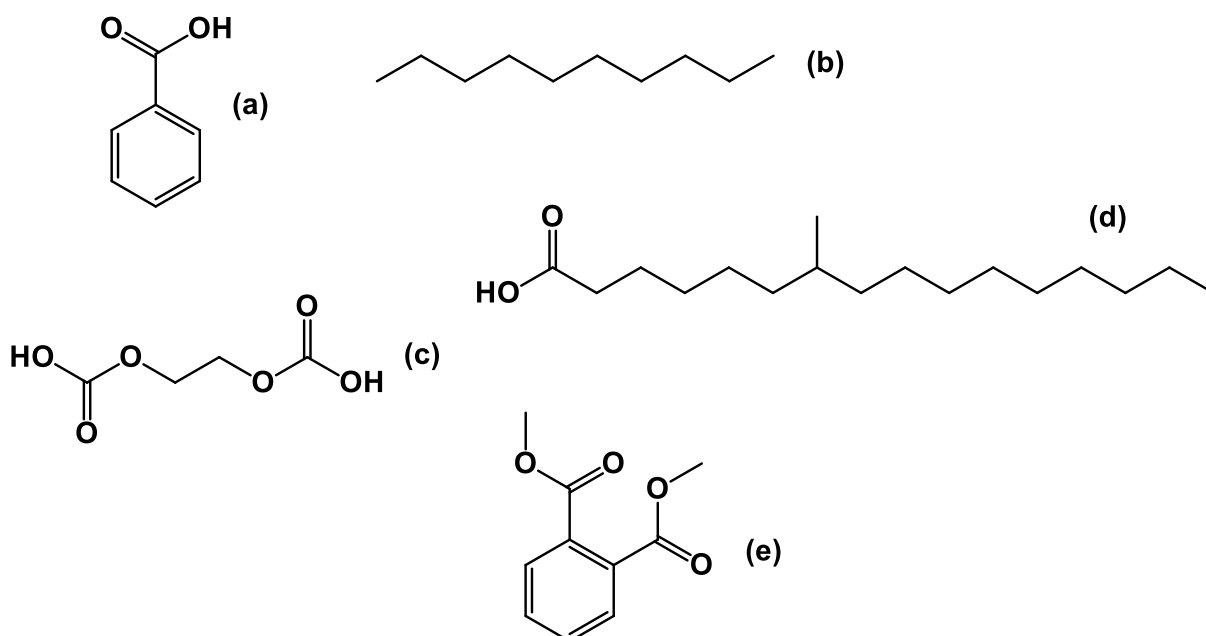


Figura 8. Estruturas do (a) ácido benzóico; (b) decano; (c) diacetil glicol; (d) ácido metil hexadecanoico e (e) éster do ácido ftálico.

Fração em diclorometano das folhas de *Saccharum officinarum*, constituídas pelos ácidos graxos palmítico, linoleico, esteárico e 8,11,14-docosatrienoico (Figura 9), e ácidos fenólicos 3,4-dimetoxibenzoico, *p*-metoxicinâmico, 3,4,5-trimetoxibenzoico, 3,4-dimetoxicinâmico (Figura 10), testada sobre sementes da planta daninha *Calopogonium mucunoides* inibiu sua germinação (35%) e crescimento de raízes (52,8%) e hipocótilos (47,1%). Testes com padrões de ácidos graxos e compostos fenólicos mostraram que uma mistura de ácido palmítico e oléico (7:3), inibiu em 45,09% o crescimento de raízes de alface, ocorrendo um acréscimo significativo na atividade inibitória do ácido graxo (palmítico), o qual sozinho exibiu supressão de crescimento de raízes (17,04%), enquanto a mistura de ácido cafeico e clorogênico (1:1) inibiu 38,87%, taxa menor que aquela apresentada somente pelo ácido cafeico que foi de 47,08%, demonstrando o que já havia sido descrito em literatura, que para fenólicos, a ação fitotóxica individual pode ser reduzida à medida que a variedade de ácidos fenólicos aumente na mistura. A combinação do ácido clorogênico (ácido

fenólico) com ácidos graxos (palmitico e oleico, 7:3) proporcionou atividade inibitória de 41,00% para inibição do crescimento de raízes de alface (GOMES *et al.* 2016)

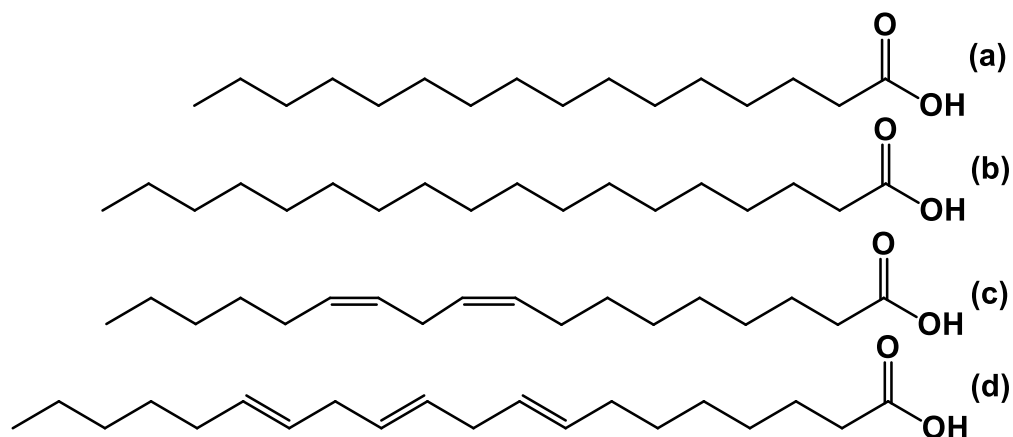


Figura 9. Estruturas do (a) ácido palmítico; (b) ácido esteárico; (c) ácido linoleico e (d) ácido 8,11,14-docosatrienoico.

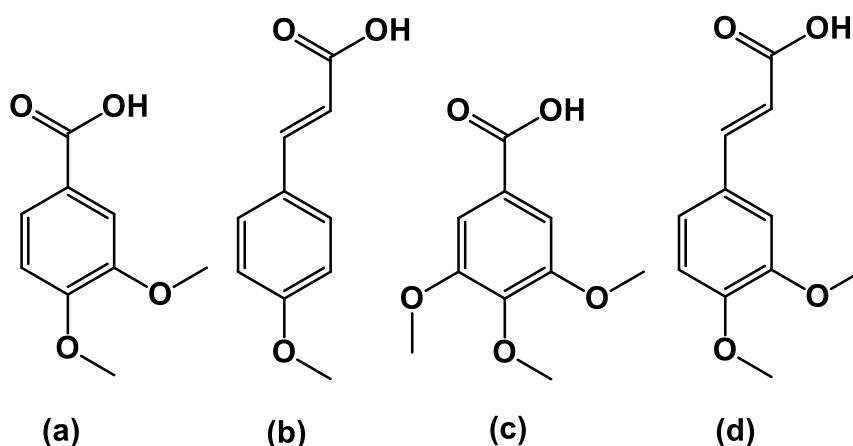


Figura 10. Estruturas do (a) ácido 3,4-dimetoxibenzóico; (b) ácido p-metoxicinâmico; (c) ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico e (d) ácido 3,4-dimetoxicinâmico.

### 1.6.3. Ação alelopática de ácidos graxos

Os ácidos graxos saturados, insaturados e poli-insaturados são referidos em literatura como compostos alelopáticos (INDERJIT e DUKE, 2003). Os ácidos palmítico e esteárico (Figura 9a e Figura 9b) são conhecidos por inibir o crescimento

de plantas (ALSAADAWI *et al.* 1983; TSUZUKI *et al.*, 1987), assim como os ésteres derivados de ácidos graxos saturados e insaturados de C<sub>6</sub> a C<sub>36</sub> (TSO, 1964).

Há indícios de que os ácidos graxos atuem sobre a membrana plasmática celular, afetando principalmente sua permeabilidade, com a formação de um canal iônico, que resulta na destruição da organização da membrana (ALAMSJAH *et al.* 2008) e dissociando pigmentos envolvidos em processos de fotossíntese (WU *et al.* 2006).

Em ácidos graxos, o número de insaturações é um fator que está relacionado à toxicidade do composto químico (CHIANG *et al.* 2004). Acredita-se que esta toxicidade seja originária de produtos de processos metabólicos ou foto-oxidativos (ALAMSJAH *et al.* 2008). Fitoplânctons expostos à presença de ácidos graxos insaturados tiveram maior perda de potássio intracelular (K<sup>+</sup>) do que aqueles em presença de ácidos graxos saturados, indicando que os insaturados causam danos mais severos à membrana celular. (WU *et al.* 2006).

Em diferentes espécies de fungos, ácidos graxos insaturados inibiram a síntese de ATP (CALVO *et al.* 1999). Além disso, a síntese de ATP em cloroplastos do espinafre e em *Lantana camara* foi inibida quando expostas a extratos ricos em ácidos graxos provenientes de *Corynespora cassiicola* (PASSOS *et al.* 2010).

Ácidos graxos insaturados poli-hidroxilados e epoxidados (Figura 11), derivados de ácidos graxos de 18 carbonos (C18) isolados de culturas de arroz (*Oryza Sativa* L.), as quais são resistentes à doença brusone, inibiram a germinação do fungo *Pyricularia oryzae* (KATO *et al.* 1983).

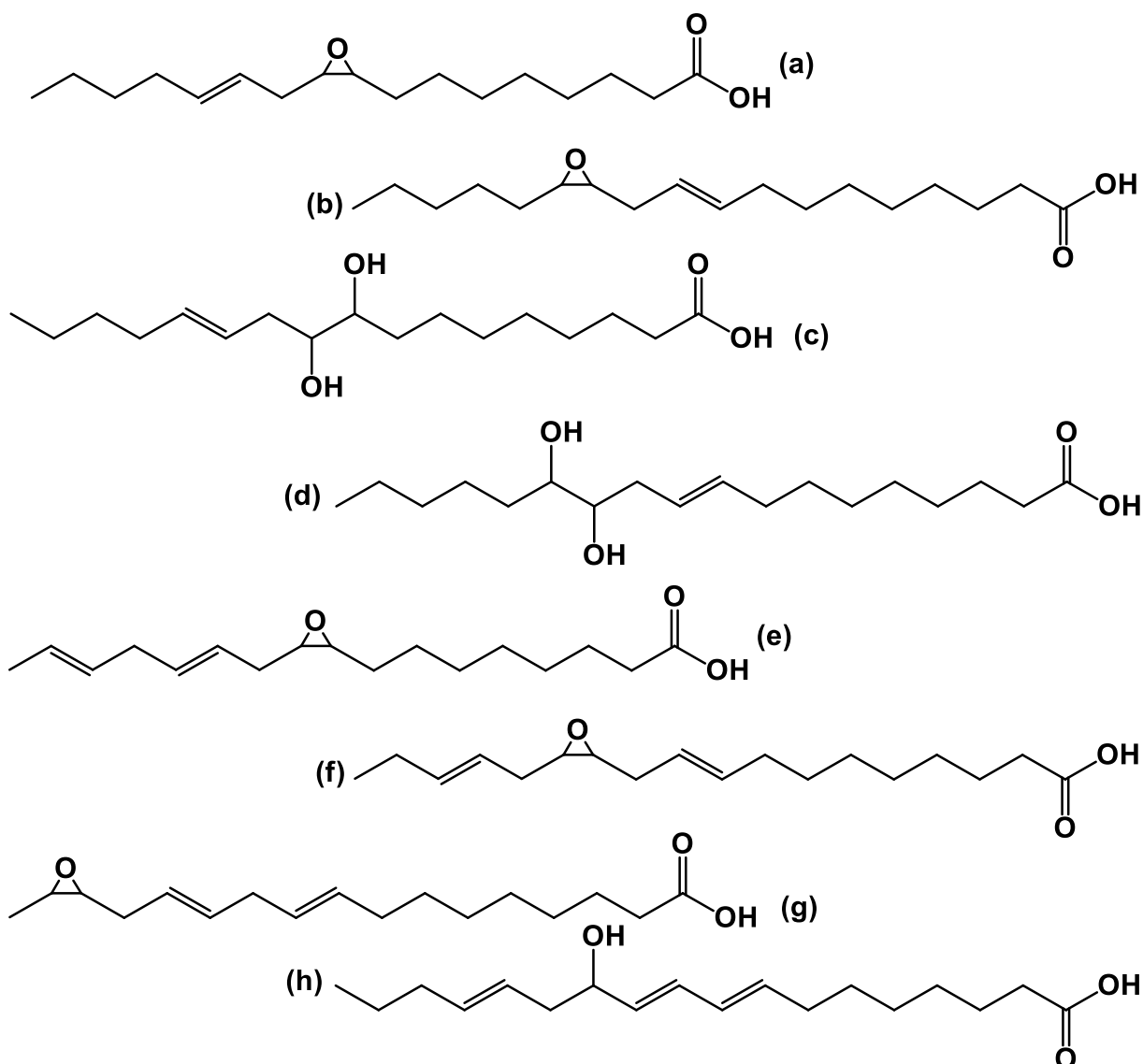


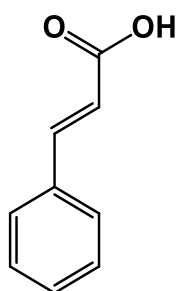
Figura 11. Estrutura do ácido (a) 9-epoxi-12-octadecenoico; (b) 12-epoxi-9-octadecenoico; (c) 9,10-dihidroxi-12-octadecenoico; (d) 12,13-didroxi-9-octadecenoico; (e) 9-epoxi-12,15-octadecadienoico; (f) 12-epoxi-9,15-octadecadienoico; (g) 15-epoxy-9,12-octadecadienoico e (h) 13-hidroxi-9, 11, 15-octadecatrienoico.

#### 1.6.4. Ação alelopática de compostos fenólicos

Os compostos alelopáticos desta classe compreendem estruturas com diferentes graus de complexidade química, desde os mais simples como ácido benzoico, cinâmico e seus derivados, flavonoides e outros polifenóis, aos mais complexos como depsídeos, depsídonas, compostos aromáticos frequentemente encontrados em líquen (MACÍAS *et al.* 2007).

Os ácidos fenólicos simples, taninos e cumarinas agem no crescimento de plantas e microrganismos, pois afetam a fisiologia vegetal. Sua toxicidade está relacionada à presença de anel aromático, devido à capacidade de interferir em processos com fluxo de carga (cátions e ânions), como fotossíntese, transporte, permeabilidade iônica da membrana celular e eliminação de radicais livres (MACÍAS *et al.* 2007).

Os ácidos benzoico (Figura 8a) e cinâmico (Figura 12), bem como seus derivados, são comumente descritos em literatura de atividade alelopática (LI *et al.* 2015). Eles estão intimamente ligados a processos fundamentais para o desenvolvimento vegetal, como defesa contra doenças (KLESSIG e MALAMY, 1994), formação de lignina (SIEGLER, 1998), entre outros. Acredita-se que atuem em funções importantes da membrana plasmática, processos enzimáticos e sistemas relacionados à energia (MACÍAS *et al.* 2007).



**Figura 12. Estrutura do ácido cinâmico.**

Os ácidos caféico, *p*-cumárico, cinâmico e sinápico (Figura 13) impedem o crescimento vegetal, já que interferem na captação de íons inorgânicos  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $H_2PO_4^-$  e nutrientes pelas raízes, desequilibrando funções celulares importantes (INDERJIT *et al.* 2002; EINHELLIG, 2005). As espécies vegetais tratadas com os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, salicílico, hidrocinâmico, *p*-hidroxibenzoico, gálico, vanilina, ácido clorogênico e hidroquinonas, apresentaram estresse hídrico, provocando perda de elasticidade e diminuição da água foliar, pois de acordo com pesquisas desenvolvidas, estes compostos causam fechamento de estômatos e restringem outras relações que envolvam água (BARKOSKY *et al.* 1999; BARKOSKY e EINHELLIG, 2003).

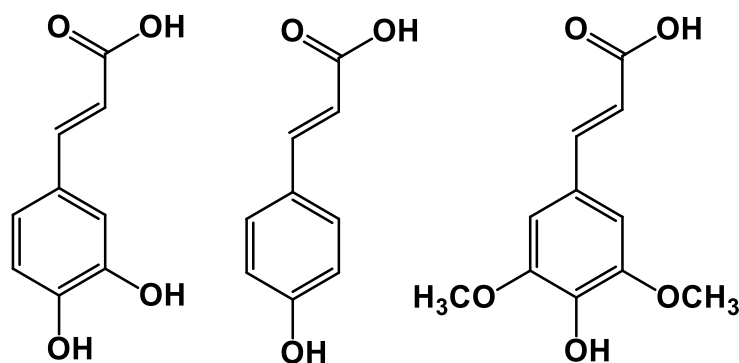


Figura 13. Estrutura do ácido (a) cafeico; (b) *p*-cumárico e (c) sinápico.

Os ácidos clorogênico (Figura 14), cafeico, cinâmico e seus derivados atuaram inibindo as enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), ATPase, fosforilase e peroxidase (LI *et al.* 2010).

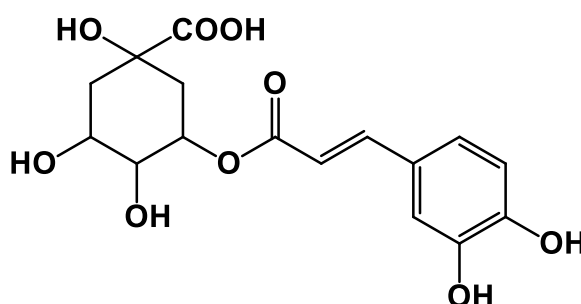


Figura 14. Estrutura ácido clorogênico.

Os ácidos *trans/cis* ferúlico, vanílico e siríngico (Figura 7) induziram em alface o rompimento de constituintes celulares das raízes, inibindo a atividade da enzima desidrogenase e diminuíram a quantidade de clorofila, consequentemente prejudicando a fotossíntese (SAMPIETRO *et al.* 2006).

Em ação indireta, ou seja, a presença de compostos alelopáticos no solo também pode influenciar o desenvolvimento de espécies, já que, os ácidos fenólicos, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzóicos e protocatecuico (Figura 15a e 15b) influenciaram na acumulação de nitrogênio orgânico e dos íons inorgânicos,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $PO_4^{3-}$  e

$\text{Al}^{3+}$  (INDERJIT e MALLIK, 1997). Já ácidos benzoicos e cinâmicos, em altas concentrações, inibem a absorção de oxigênio em mitocôndrias (MORELAND e NOVITZKY, 1987) e, nas nitrossomonas, compostos fenólicos como ácidos cafeico e ferúlico, o flavonoide miricetina (Figura 15c), taninos e seus derivados inibem a oxidação de  $\text{NH}_4$  e  $\text{NO}_2$ , diminuindo a disponibilidade de nitrogênio para as plantas. (RICE, 1984).

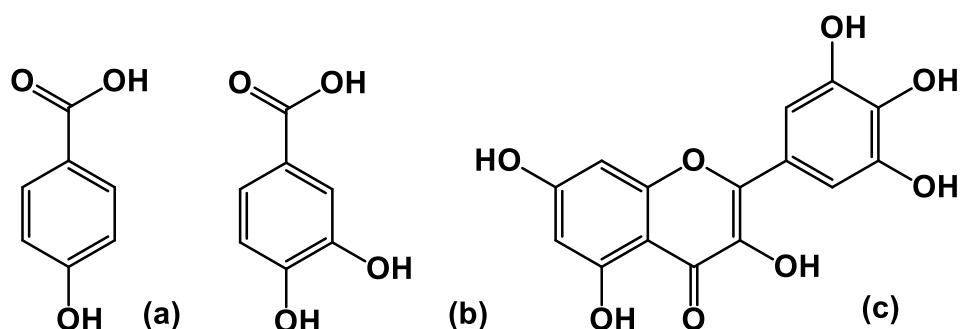


Figura 15. Estruturas do ácido (a) *p*-hidroxibenzoico; (b) protocatecuico e flavonoide (c) miricetina.

Os flavonoides, em geral, não apresentam ação fitotóxica, exceto algumas exceções como quercetina e naringenina (Figura 16), mas participam de outras atividades na planta (MACÍAS *et al.* 2007). A ação fitotóxica está relacionada à inibição da captura de  $\text{O}_2$  das mitocôndrias, promovendo também o impedimento no transporte de elétrons devido a danos causados a membrana mitocondrial. Ações de flavonoides envolvendo inibição na hidrólise de ATP catalisada pela  $\text{Mg}^{+2}$ -ATPase são relatados (EINHELLIG, 2005).

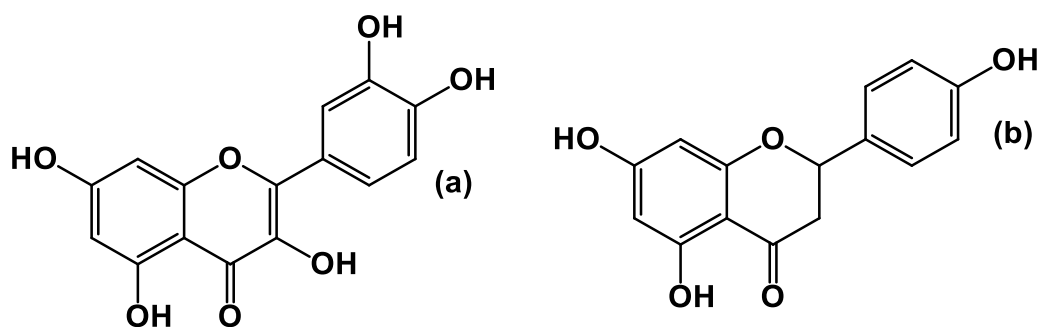


Figura 16. Estruturas do flavonoide (a) quercetina e (b) naringenina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Identificar ácidos graxos e compostos fenólicos presentes em resíduos de vinhaça, torta de filtro e bagaço, advindas da indústria sucroalcooleira, através de técnicas cromatográficas e espectrométricas, bem como avaliar a atividade fitotóxica.

### 2.2. Objetivos específicos

- ❖ Obter partições lipofílicas e hidrofílicas da vinhaça através do particionamento líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades.
- ❖ Obter por maceração extrato alcóolico e acetônico do decantado da vinhaça.
- ❖ Obter extratos lipofílicos e alcóolicos da torta de filtro através de maceração e alcóolico sob-refluxo e alcóolicos em meio alcalino sob refluxo.
- ❖ Obter extratos alcóolicos e alcóolicos meio alcalino sob refluxo do bagaço;
- ❖ Identificação de ácidos graxos e compostos fenólicos presentes nas partições da vinhaça e extratos da torta de filtro e bagaço por CG-EM e ESI-FT-ICR-MS;
- ❖ Avaliar a fitotoxicidade através de bioensaios com diferentes partições e/ou extratos de vinhaça, torta de filtro e bagaço, frente a sementes da espécie teste *Lactuca sativa* (alface) e *Ipomoea purpurea* (espécie daninha).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Resíduos**

A vinhaça e a torta de filtro foram cedidas pela Usina Paineiras, localizada no município de Itapemirim, Espírito Santo (Brasil), no início da safra do ano 2016, no mês de maio. O bagaço foi coletado em estabelecimento comercial no município de Vitória, Espírito Santo (Brasil).

Todo material foi imediatamente congelado, a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

##### **3.1.2. Solventes**

- ❖ Solventes em grau para análise (P.A.) foram utilizados nas extrações e nas partições dos resíduos, e em grau espectroscópio para as análises por espectrometria de massas e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.
- ❖ Água destilada para ressuspensão de amostra.

##### **3.1.3. Reagentes**

- ❖ Determinação de fenólicos totais: soluções de Folin–Ciocalteu SPECTRUM<sup>®</sup> (10% em H<sub>2</sub>O destilada) e carbonato de sódio (20 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro em H<sub>2</sub>O destilada) VETEC.
- ❖ Determinação de pH: papel indicador de pH (0-14) Merck<sup>®</sup>.

##### **3.1.4. Bioensaio de fitotoxicidade**

- ❖ Solução de DMSO (Tedia<sup>®</sup>) a 0,1% em água destilada para solubilização das amostras;

- ❖ Padrão de menadiona (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) utilizado como controle positivo;
- ❖ Sementes de *Lactuca sativa* (alface) adquiridas da empresa Isla Pak, Porto Alegre-RS;
- ❖ Sementes de *Ipomoea purpurea* (planta daninha) fornecida pela empresa Isla Sementes<sup>®</sup>.

### 3.1.5. Equipamentos

- ❖ A análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada em equipamento Agilent Technologies modelo 7890B, com detector de massas Agilent Technologies modelo 5977A. A coluna utilizada foi coluna DB5-MS (5% fenil, 95% metilpolisiloxano) com 30 m de comprimento × 0.25 mm diâmetro interno × 0.25 µm de espessura de fase estacionária (J&W Scientific, Agilent Technologies, USA).
- ❖ A análise de espectrometria de massas com ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR MS) foi realizada em equipamento Bruker (modelo 9.4 T Solarix) com ionização por *electrospray* (ESI). A operação foi em modo negativo ESI (-) e a faixa de massas de 150 a 1200 m/z. Os parâmetros experimentais da fonte de ESI (-), tensão do capilar 3.8 Kv, temperatura de transferência de capilar 200°C e pressão do gás nebulizador 1,4 Bar. O tempo de acumulação de íons foi de 0,010 segundos e a aquisição de espectros foi realizada a partir da acumulação de 32 scans e um domínio de tempo de 500 k. A calibração dos espectros foi feita externamente utilizando NaTFA (m/z de 200 a 1200). Os espectros adquiridos foram analisados no programa Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A composição elementar foi determinada por razão massa/carga (m/z) de cada sinal. Os experimentos de espectrometria de massas sequencial (“*Tandem Mass Spectrometry*” - MS<sup>2</sup>) foram realizados em analisador quadrupolo acoplados ao espectrômetro de massas.

- ❖ O teor de fenólicos totais realizou-se em um leitor de microplacas modelo SPECTRA MAX 190 (molecular device). Precisão fotométrica/ linearidade (microplaca) 0–2,0 OD: 190-850 nm, <  $\pm 0,006$  OD  $\pm 1,0\%$ . Precisão fotométrica (repetibilidade) 0-2,0 OD: 190–850 nm, <  $\pm 0,003$  OD  $\pm 1,0\%$ .
- ❖ O evaporador rotatório R-100, com bomba de vácuo V-100 (BUCHI) foi utilizado para a evaporação dos extratos e frações.
- ❖ Centrífuga microprocessada Quimis para a separação da vinhaça.
- ❖ A pesagem de todo material ocorreu em balança analítica Shimadzu modelo AUW220D.

## **3.2. Métodos e técnicas**

### **3.2.1. Preparação das frações e extratos**

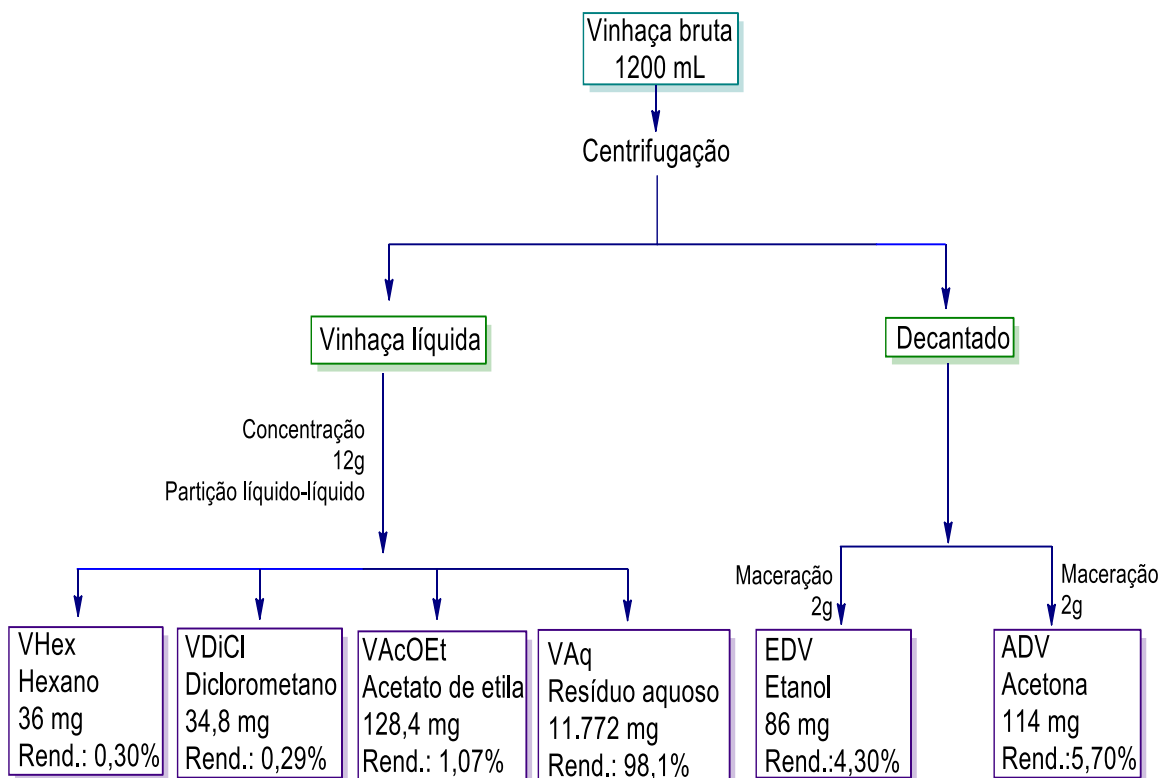
#### **3.2.1.1. Vinhaça**

O subproduto líquido foi centrifugado, separando-se em duas partes: líquido e decantado.

O líquido separado (1200 mL) foi concentrado em evaporador rotatório sob vácuo a uma temperatura de 40°C e pressão de 65 milibar. Do extrato seco, 12g foram ressuspensos em água destilada (20 mL), em seguida, a suspensão aquosa foi submetida a extrações líquido-líquido sucessivas (100 mL x 3) em solventes orgânicos com grau de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila, as partições foram nomeadas VHex, VDiCl, VAcOEt e Vaq (resíduo aquoso), respectivamente (Esquema 3). As partições foram concentradas em evaporador rotatório a pressão reduzida, obtendo-se os rendimentos de 0,3% para a fração hexânica, 0,29% para a fração em diclorometano, 1,07% para a fração acetato de etila e 98,1% para o resíduo aquoso.

Do decantado, 5g foram macerados a frio por 24h em acetona e etanol separadamente, filtrados e concentrados em evaporador rotativo sob vácuo. Os rendimentos foram 5,70% para o extrato em acetona, nomeado ADV e 4,30% para o

extrato em etanol chamado de EDV (Esquema 3).



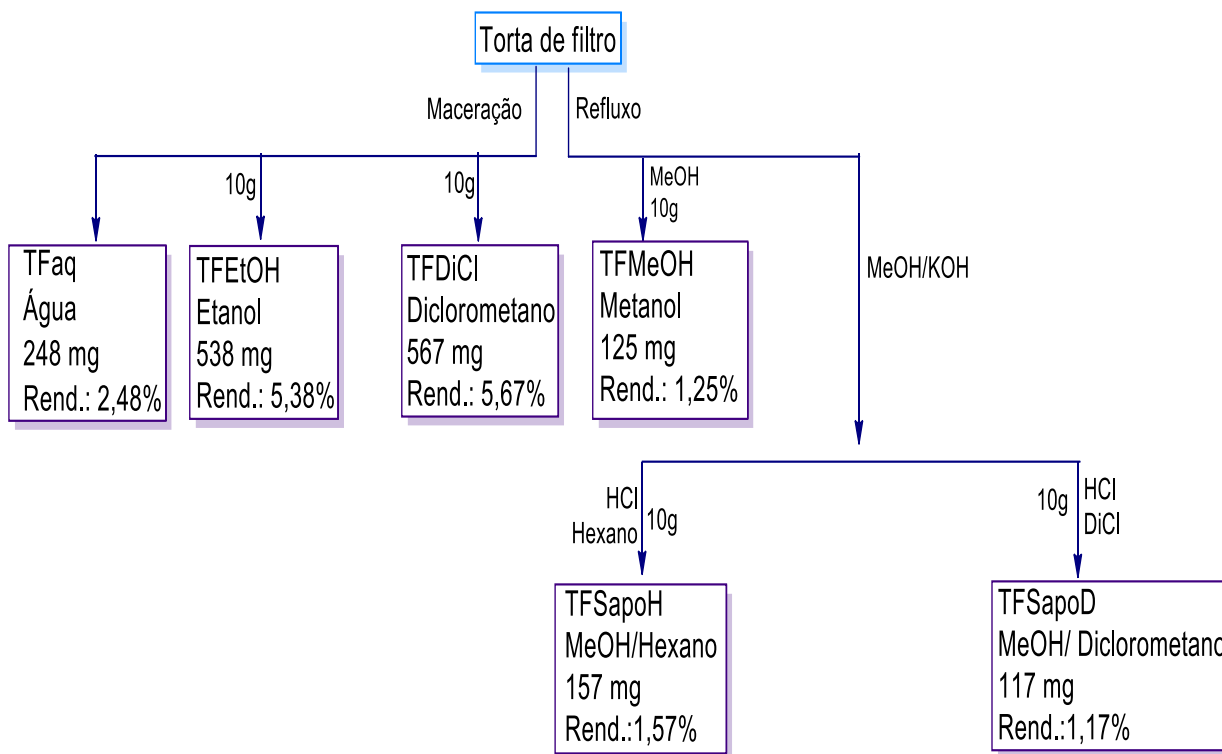
**Esquema 3. Processamento laboratorial da extração e/ou partição da vinhaça.**

### 3.2.1.2. Torta de filtro

Do subproduto sólido, 10g foram macerados em água, etanol e diclorometano, separadamente, por 24 horas com agitação pontual. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a uma temperatura de 40°C e pressão de 50 milibar. O rendimento para a extração em água foi de 2,48% e a amostra foi chamada de TFAq, o rendimento da extração etanólica foi de 5,40% e nomeada TFEtOH, enquanto para a extração diclorometano foi de 6,11%, chamada de TFDiCl (Esquema 4).

Uma amostra de 10g da torta de filtro foi refluxada em metanol e hidróxido de potássio (MeOH/KOH) 0,5 M, separadamente a 60°C por 10 min. A amostra em metanol, foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob vácuo, sendo nomeada TFMeOH e seu rendimento foi de 1,25%. A amostra em MeOH/KOH,

também passou por filtração e posterior acidificação com HCl 1M, o sobrenadante foi coletado e realizado extração líquido-líquido em hexano e, em seguida, concentrado, sendo chamada de TF SapoH, com rendimento de 1,57%. O procedimento em refluxo com MeOH/KOH, descrito anteriormente, foi repetido, e a extração líquido-líquido foi realizada utilizando o solvente diclorometano, sendo nomeada TF SapoD, com rendimento de 1,17% (Esquema 4).

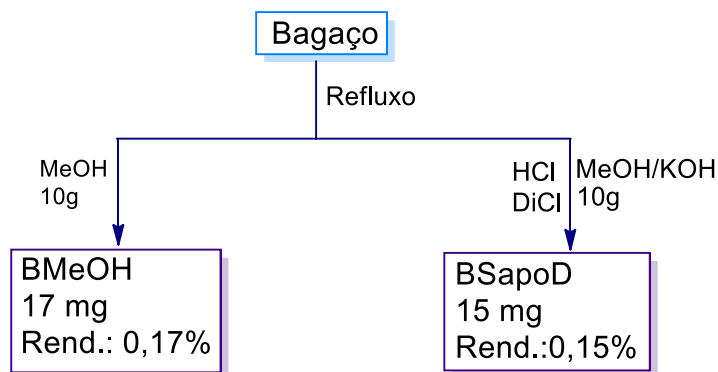


Esquema 4. Procedimento laboratorial de extração e/ou partição da Torta de filtro.

### 3.2.1.3. Bagaço

O resíduo sólido bagaço, 10 gramas foi refluxado separadamente em MeOH e MeOH/KOH 0,5 M, a 60°C por 10 min. Filtrou-se a amostra em MeOH e em seguida, concentrou-se em evaporador rotativo sob vácuo, obtendo-se rendimento de 0,15%, a amostra foi denominada de BMeOH. Para a amostra em MeOH/KOH, aplicou-se filtração e adição de HCl 1 M, até acidificação, o sobrenadante foi coletado e realizado uma extração líquido-líquido em diclorometano, a parte orgânica foi

concentrada e nomeada de BSapoD (Esquema 5).



Esquema 5. Procedimento laboratorial de extração e/ou partição do Bagaço.

### 3.2.2. ESI (-) FT ICR MS e ESI (-)-MS/MS (DIC)

As frações e extratos foram dissolvidas em 1 mL de solução de acetonitrila e água destilada (50%v/v), alcalinizadas com 4 $\mu$ L NH<sub>4</sub>OH e introduzidas a uma taxa de fluxo de 6  $\mu$ L/min na fonte ESI (-).

Os parâmetros experimentais da fonte de ESI (-), tensão do capilar 3,8 Kv, temperatura de transferência de capilar 200°C e pressão do gás nebulizador 1,4 Bar. O tempo de acumulação de íons foi de 0,010 segundos e a aquisição de espectros foi realizada a partir da acumulação de 32 scans e um domínio de tempo de 500 k. A calibração dos espectros foi feita externamente utilizando NaTFA ( $m/z$  de 200 a 1200). Com a potência de resolução do equipamento e a precisão de massa menor <1-2 ppm, foi possível atribuir inequivocamente a fórmula molecular de íons carregados.

Os espectros adquiridos foram analisados no programa Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A composição elementar foi determinada por razão massa/carga ( $m/z$ ) de cada sinal. As propostas de fórmula para as  $m/z$  foram obtidas através dos dados químicos descritos na literatura para moléculas isoladas e/ou identificadas de *Saccharum ssp.*

As análises por espectrometria de massas em sequencial (MS/MS) foram realizadas por um analisador quadrupolo acoplado a um espectrômetro de massas (FT-ICR). Os espectros de ESI (-) MS/MS foram adquiridos para a confirmação dos compostos, entretanto, devido à resolução do equipamento, só foi possível realizar esse experimento para  $m/z$  acima de 250, foram selecionados os três primeiros dígitos de  $m/z$  dos compostos. Os parâmetros utilizados foram taxa de fluxo de perfusão de 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; voltagem capilar de -3,9 kV; temperatura de nebulização de 250 °C; argônio como gás de colisão; tempo de acumulação do íon de 1 s; janela de isolamento 2,0 ( $m/z$  unidade); e 15–23% da energia de colisão.

### **3.2.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)**

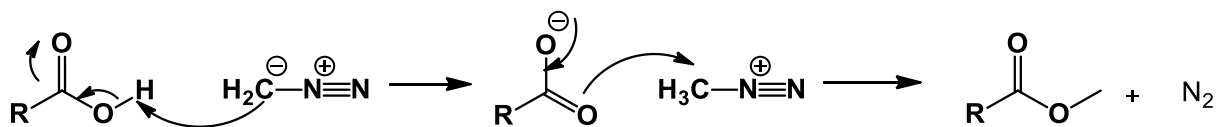
Os extratos e frações previamente derivatizados com diazometano ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) e padrão de *n*-alcanos (C9-C34) (Sigma-Aldrich) foram analisados por CG-EM com ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna DB5-MS. A programação de temperatura do forno iniciou em 80 °C, com um incremento de 15°C/min até 210 °C, mantido em isoterma por 10 minutos, 2°C/min até atingir 245°C permanecendo por 20 min, 10°C/min até 310°C mantida por 12 min, totalizando tempo de análise de 42 min. A temperatura do injetor/interface e fonte de íons foi mantida em 280 °C. As análises foram realizadas em modo split 20 e o gás Hélio (5,0) foi usado como gás de arraste em fluxo constante de 0,89 mL/min. A faixa de massas analisada foi de 50 a 500 Da.

Os sinais cromatográficos representando as moléculas separadas foram identificados através do índice de similaridade de seus espectros de massas ( $\geq 90\%$ ) fornecidos pela biblioteca NIST 11 e por comparação dos seus índices de Kovats com a literatura.

#### **3.2.3.1. Processo de derivatização das amostras**

Para cada 1 mg de amostra foram adicionados 1,5 mL de diazometano ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ), o recipiente da mistura é vedado e permanece em congelador a -18°C, por 24 horas,

após esse período o frasco é aberto a temperatura ambiente para a evaporação do nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>), o esquema 6, mostra a reação genérica de metilação.



Esquema 6. Processo genérico de derivatização (metilação).

### 3.2.4. Bioensaio de atividade fitotóxica

Os experimentos para a avaliação da atividade fitotóxica foram realizadas no laboratório de produtos naturais e ensaios biológicos (Lapronreb) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os extratos e frações dos subprodutos vinhaça, torta de filtro e bagaço foram testadas quanto a atividade fitotóxica, nas concentrações 250 e 500 ppm, utilizando-se como semente teste a espécie *Lactuca sativa* (alface), que se destaca em ensaios de germinação e crescimento por apresentar germinação rápida e uniforme, normalmente finalizados em 120 horas (TORRES RODRÍGUEZ, 2003). As sementes da espécie daninha *Ipomoea purpurea* foram utilizadas para extratos e/ou partições com taxa de inibição acima de 55% previamente observadas sobre *L. sativa*.

#### 3.2.4.1. Germinação

As partições foram dissolvidas em solvente orgânico adequado (MeOH ou CHCl<sub>3</sub>), o resíduo aquoso dissolvido em água destilada, e o volume ajustado para as concentrações desejadas. Cada placa de Petri (d=6,0 cm, h= 1,5 cm) contendo discos de papel de filtro, recebeu 0,5 mL da solução teste. Após a evaporação do solvente orgânico em temperatura ambiente (durante 24 h), foram adicionados 2,5 mL da solução DMSO 0,1% (em água destilada) e 10 sementes de *L. sativa* ou 10

sementes da espécie daninha *Ipomoea purpurea*. Para soluções aquosas, o volume de 0,5 mL da solução teste foi adicionado na concentração adequada, e em seguida, mais 2,0 mL da solução de DMSO 0,1% foram adicionados. Os bioensaios foram efetuados em triplicata com três repetições. Como controles sem tratamento foram utilizadas placas de Petri com discos de papel contendo 2,5 mL de água destilada e 2,5mL de DMSO 0,1%.

Os bioensaios foram conduzidos em câmara de crescimento em ausência de luz, com temperatura em torno de 25 °C. A germinação de sementes foi determinada a partir da protusão radicular, 24 horas após a semeadura. As porcentagens de inibição de germinação foram calculadas por comparação com o controle sem tratamento, utilizando o seguinte cálculo (Equação 2):

$$\% \text{ Inibição} = \frac{C-X}{C} \times 100$$

**Equação 2. Porcentagem de germinação de sementes.**

C= n° de sementes germinadas no controle e X= n° de sementes germinadas na amostra-teste.

#### **3.2.4.2. Crescimento de raízes e hipocótilos**

O crescimento das plântulas de *L. sativa* foi avaliado medindo-se o comprimento dos hipocótilos e radículas em papel milimetrado, 5 dias após a introdução das sementes. As porcentagens de inibição do crescimento das raízes e dos hipocótilos foram calculadas por comparação com o controle sem tratamento, utilizando o seguinte cálculo (Equação 3):

$$\% \text{ Inibição} = \frac{C-X}{C} \times 100$$

**Equação 3. Crescimento de raízes e hipocótilos.**

C= tamanho médio do hipocótilo/raízes no controle e X= tamanho médio do hipocótilo/raízes na amostra-teste (CHIAPUSIO *et al.*1997). Como controle positivo utilizou-se a menadiona (naftoquinona) a 143 ppm (CI<sub>50</sub> previamente estabelecida no trabalho de BARATELLI, 2006). O mesmo protocolo foi aplicado para avaliação da espécie *Ipomoea purpurea*.

### **3.2.5. Análise estatística dos resultados e determinação de concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>)**

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) segundo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, e a Concentração Inibitória Média (CI<sub>50</sub>) foi calculada por regressão não-linear, ambos através do *software* Graph Pad Prism.

### **3.2.6. Análises de compostos fenólicos totais**

A determinação de fenólicos totais seguiu a metodologia descrita em Singleton *et al.*, (1999), modificado. Foram preparadas soluções de 1000 µg/mL de cada amostra em etanol (Vetec Fine Chemicals Ltda.). Aos poços da microplaca foi adicionada alíquota de 30 µL de amostra, 150 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) na proporção 1:10, e após 5 min, 120 µL de carbonato de sódio a 7% (Vetec, Fine Chemicals Ltda), em triplicata. Decorridos 90 min de reação ao abrigo luz, foram realizadas leituras das absorbâncias em espectrofotômetro a 740 nm. Utilizou-se como padrão o ácido clorogênico (Sigma-Aldrich), nas concentrações 6,25; 12,5; 25,0; 37,5; 50,0; 75,0 e 100 µg/ml para construir a curva de calibração. A partir da equação da reta obtida, calculou-se o teor de fenólicos totais em mg EAC/g de extrato. Os trabalhos de DUARTE-ALMEIDA (2006) e CADERBY *et al.* 2013 indicam que o ácido clorogênico seja o padrão mais adequado para a obtenção de curva de calibração, já que os compostos fenólicos presentes em *S. officinarum* são derivados do ácido clorogênico.

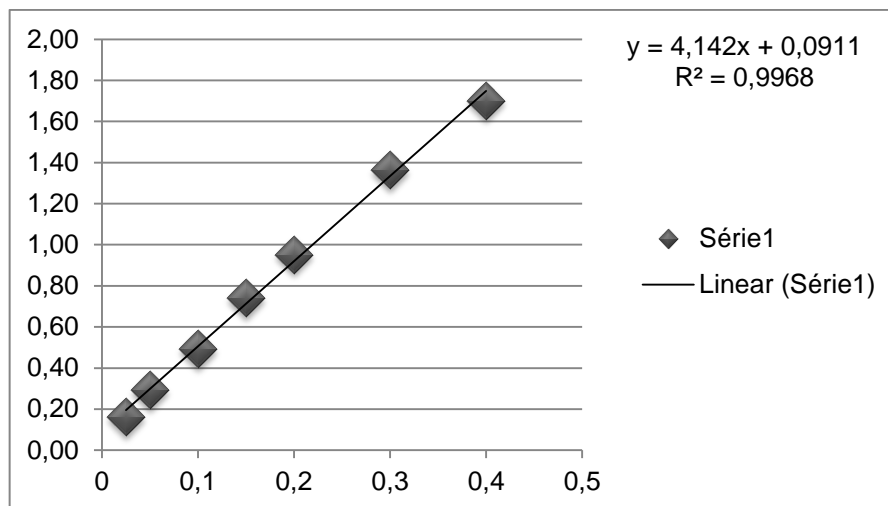


Gráfico 1. Curva de calibração do ácido clorogênico.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análises fitoquímicas dos resíduos

#### 4.1.1. Análise de ácidos graxos e compostos fenólicos por ESI (-) FT-ICR-MS

A análise por espectrometria de massas acoplada à ressonância ciclôtrica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR-MS) dos resíduos foi realizada por ionização em modo negativo (ESI (-)). A presença de íons como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  em produtos naturais torna a utilização da ionização em modo negativo (ESI (-)) preferível, já que por essa técnica a supressão iônica é minimizada, simplificando a interpretação dos sinais (COSTA *et al.* 2015). Em modo negativo, as moléculas ou analitos são desprotonados (íon  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ), tais como substâncias que contêm hidrogênios ácidos, como fenóis e ácidos carboxílicos. Eles sofrem desprotonação mais facilmente, portanto, sendo analisados em modo negativo (COLE, 1997).

A altíssima resolução e exatidão da análise FT-ICR-MS permitiu a identificação das substâncias químicas com intensidade relativa (RI) > 1% e com erro de massa < 2 ppm. Experimentos por dissociação induzida por colisão (DIC) foram realizados para a proposição das estruturas.

No trabalho de KERWIN *et al.* (1996), as técnicas por ESI-MS e ESI-MS/MS foram utilizadas para identificação de ácidos graxos, destacando a rapidez de análise e elevada sensibilidade. No trabalho de HOSSAIN *et al.* (2010), a massa precisa de íons pseudomoleculares  $[\text{M}-\text{H}]^-$  e espectrometria de massa em tandem (ESI -MS / MS) foram utilizados para elucidação estrutural de 17 compostos fenólicos, ressaltando que a precisão da massa foi importante para diferenciação dos compostos e que as informações observadas forneceram dados para identificação dos mesmos.

Para os ácidos graxos saturados, os espectros de fragmentação mostram, comumente, perdas de  $\text{H}_2\text{O}$ . Já a fragmentação de ácidos graxos monoinsaturados são similares aos dos saturados, com desidratação e eventualmente perda de  $\text{CO}_2$ ; a posição da dupla ligação é atribuída normalmente à perda do carbono vicinal ou à remoção do carbono da dupla, ao lado do grupo carboxila. Enquanto os espectros de fragmentação dos ácidos di e tri-insaturados apresentam frequentemente a perda

de  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  e  $(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2$ , e a presença das duplas ligações fornece maiores informações estruturais, geralmente facilitando a identificação da substância química (KERWIN *et al.* 1996).

Na fragmentação de ácidos fenólicos, derivados do benzoico e cinâmico, ionizados em modo negativo, é comum que apresentem perda correspondente a 44u, referente ao  $\text{CO}_2$  do grupo carboxílico. Na fragmentação de flavonoides geralmente se observa a perda de  $\text{H}_2\text{O}$ , bem como uma fração de açúcar nos flavonóides glicosilados (HOSSAIN *et al.* 2010).

Foram propostas 22 substâncias, entre elas, 10 ácidos graxos e 12 compostos fenólicos. Na tabela 6 são apresentados, massa molecular medida (M.E) fórmula molecular (F.M), fragmentos de  $\text{MS}^2$ , erro de massa (ppm), proposta para o compostos, índice de deficiência de hidrogênio (IDH), bem como a intensidade relativa das substâncias químicas nas respectivas amostras.

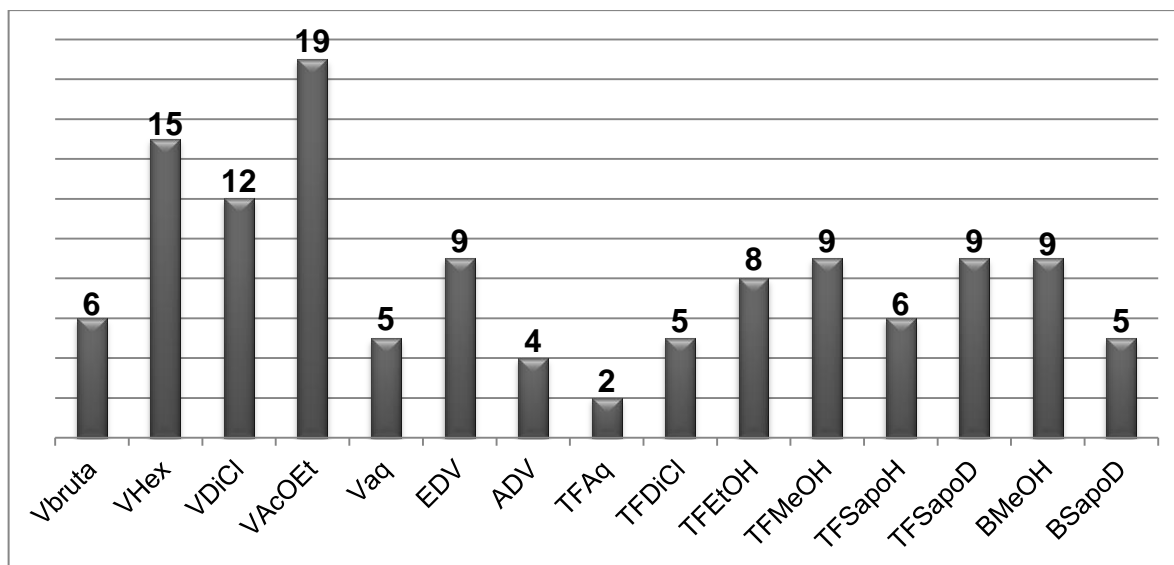
Tabela 6. Parâmetros como valores de m/z medido, erro de massa (ppm), IDH, fórmula mínima e estrutura proposta para os sinais detectados nos resíduos.

M.E	F.M	E R R O	I D H	MS <sup>2</sup>	Proposta	Intensidade (%)														
						V Bruta	V Hex	V DiCl	V AcOEt	V aq	E D V	A D V	TF Aq	TF DiCl	TF EtOH	TF MeOH	TF SapoH	TF SapoD	B MeOH	B SapoD
163, 04007	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	-0,03	6,5	-	Ácido <i>p</i> - Cumárico	-	-	-	8,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
167, 03493	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	0,32	5,5	-	Ácido Vanílico	-	2,74	2,35	10,5 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
177, 05552	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	1,13	6,5	-	Ácido <i>p</i> - Cinâmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100, 0
193, 05072	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	-0,46	6,5	-	Ácido Ferúlico	-	2,28	1,73	3,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,89
197, 04561	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	-0,32	5,5	-	Ácido Siríngico	-	11,8 5	12,0 4	23,2 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
223, 0614	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	-0,91	7,5	-	Ácido Sinápico	-	3,53	4,05	12,7 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
253, 21752	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	-0,86	2,5	209	Ácido Palmitoleico	-	42,1 3	3,96	15,1 8	1,9 2	-	-	-	-	2,04	2,64	1,73	2,0	3,46	-
255, 23308	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	-0,49	1,5	202 176	Ácido Palmitico	-	70,4 2	14,7 0	39,5 9	-	1,32	-	-	17,3 5	15,0 8	79,2 5	27,4 0	62,4 4	100, 0	3,10
277, 21757	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	-0,95	4,5	233 202 197	Ácido Linolenico	-	6,15	-	4,39	-	-	-	-	16,6 3	15,9 5	12,0 8	12,6 4	12,5 4	6,83	-

<b>279,</b> <b>23316</b>	$C_{18}H_{31}O_2$	-0,74	3,5	261	Ácido Linoleico	-	18,3	2,98	9,14	-	-	-	-	89,3	100,	100,	100,	100,	37,5	3,58	
				242																	
				235																	
				206																	
<b>281,</b> <b>24874</b>	$C_{18}H_{33}O_2$	-0,49	2,5	237	Ácido Oleico	4,0	18,9	4,60	14,2	-	-	-	-	25,7	38,3	36,3	30,4	51,6	14,5	-	
				219																	
				202																	
				197																	
<b>283,</b> <b>26420</b>	$C_{18}H_{35}O_2$	-0,63	1,5	163	Ácido Esteárico	-	34,7	10,3	28,9	-	-	-	-	3,09	4,88	35,5	4,91	15,4	98,8	2,24	
				255																	
<b>299,</b> <b>25950</b>	$C_{18}H_{35}O_3$	-1,10	1,5	284	Ácido 17- hidroxi- Esteárico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,62	-	1,30	1,60	-	
				239																	
<b>327,</b> <b>21791</b>	$C_{18}H_{31}O_5$	-0,66	3,5	309	Ácido 9,12,13- trihidroxi- 10,15- octadecadienoico	-	20,8	24,8	9,85	2,0	1,27	-	12,1	-	4,74	5,76	-	3,73	13,2	0	-
				291																	
				265																	
				255																	
<b>329,</b> <b>23348</b>	$C_{18}H_{33}O_5$	-0,41	2,5	314	Ácido 9,12,13- Trihidroxi-10- octadecenoico /Ácido 9,10,13 trihidroxi-11- octadecenoico	-	73,9	100,	23,4	1,5	3,58	-	16,5	-	4,55	9,73	-	4,95	22,7	2	-
				299																	
				229																	
				211																	
<b>353,</b> <b>08812</b>	$C_{16}H_{17}O_9$	-0,88	8,5	237	Ácido Cafeoilquínico	-	-	-	24,4	4,8	10,8	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	
				176																	



A variedade de substâncias químicas por amostras é observada no Gráfico 2.



**Gráfico 2. Variedade de substâncias presentes nas amostras.**

Nas partições da vinhaça foi observada a maior variedade de ácidos graxos e de compostos fenólicos (Gráfico 2 e Tabela 6).

Na vinhaça bruta apenas sinais de ácidos graxos em baixíssima intensidade foram identificados (Figura 17 e Tabela 6), tal constatação sugere que os constituintes estejam muito diluídos, já que este resíduo tem elevada quantidade de água, cerca de 93% (GÓMEZ e RODRÍGUEZ, 2000), justificando o processo de concentração realizado para este estudo. A concentração da vinhaça é realizada industrialmente para reduzir o volume do efluente, minimizando os custos com transporte e flexibilizando a dosagem em solo (CARVALHO e SILVA, 2010).

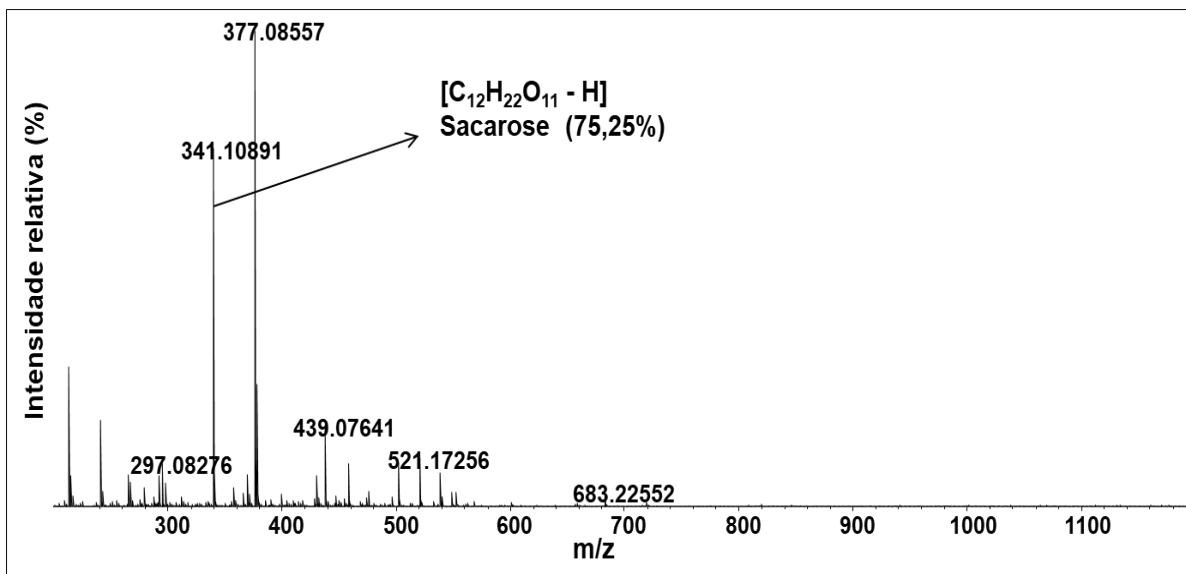


Figura 17. Espectro de massas por ESI (-) da amostra VBruta.

A partição em hexano da vinhaça apresentou em sua constituição compostos fenólicos, tal ocorrência possivelmente foi ocasionada pela formação de uma emulsão água-hexano que carregou estes compostos mais polares para a fase orgânica. Os sinais com intensidade relativa mais relevantes das classes ácidos graxos e ácidos fenólicos foram ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico/9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico (73,99%) e ácido siríngico (11,85%), respectivamente (Figura 18 e Tabela 6).

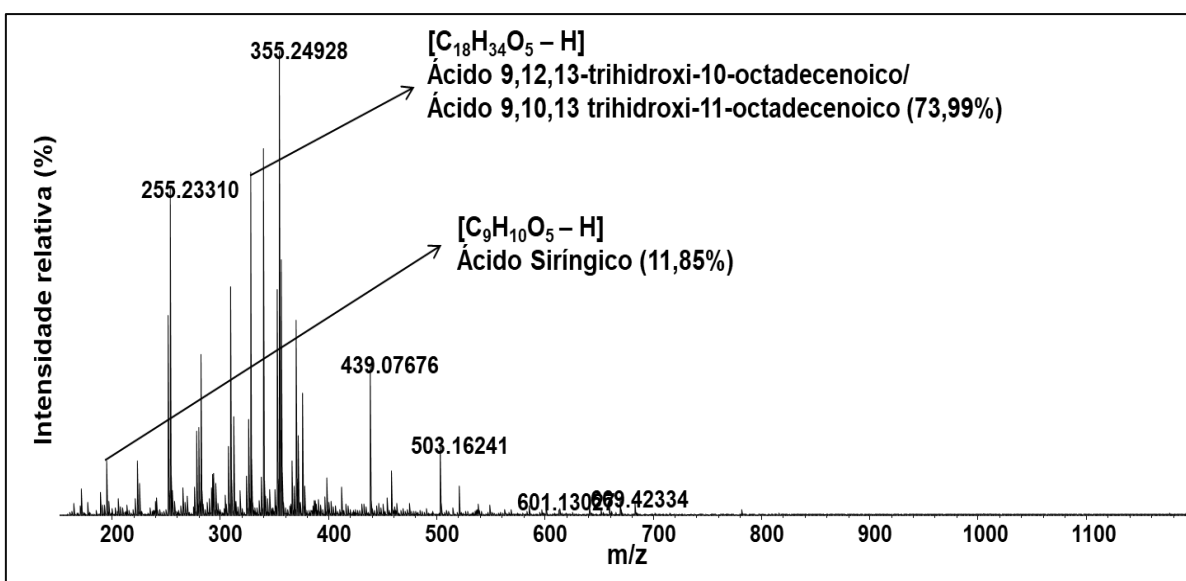


Figura 18. Espectro de massas por ESI (-) da amostra VHex.

A partição em diclorometano da vinhaça apresenta uma mistura de ácidos graxos e ácidos fenólicos. Os sinais com maior intensidade relativa de cada classe são os correspondente aos ácidos graxos insaturados e poli-hidroxiados, ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico/ 9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico (100,0%), e ao ácido fenólico, ácido siríngico (12,04%) (Figura 19 e Tabela 6).

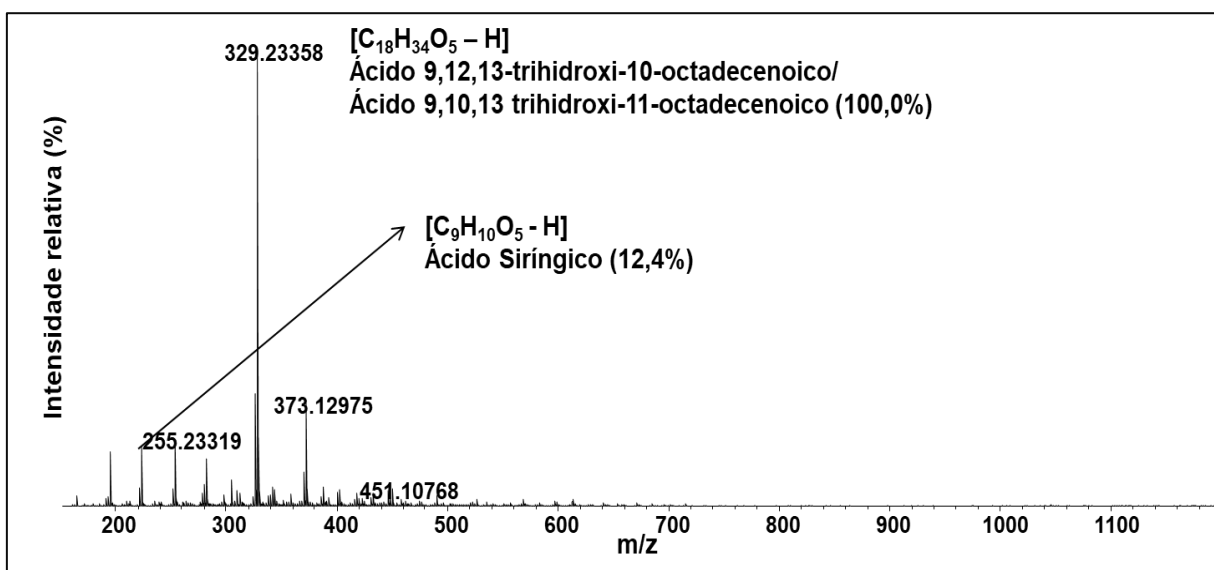


Figura 19. Espectro de massas por ESI (-) da amostra VDiCl.

Na partição em acetato de etila da vinhaça, além dos ácidos graxos e ácidos fenólicos, observa-se também a presença de flavonoides. Os sinais com maior intensidade relativa por classe são ácido palmítico (39,59%), ácido feruloilquínico (100,0%) e vitexina (21,29%) (Figura 20 e Tabela 6).

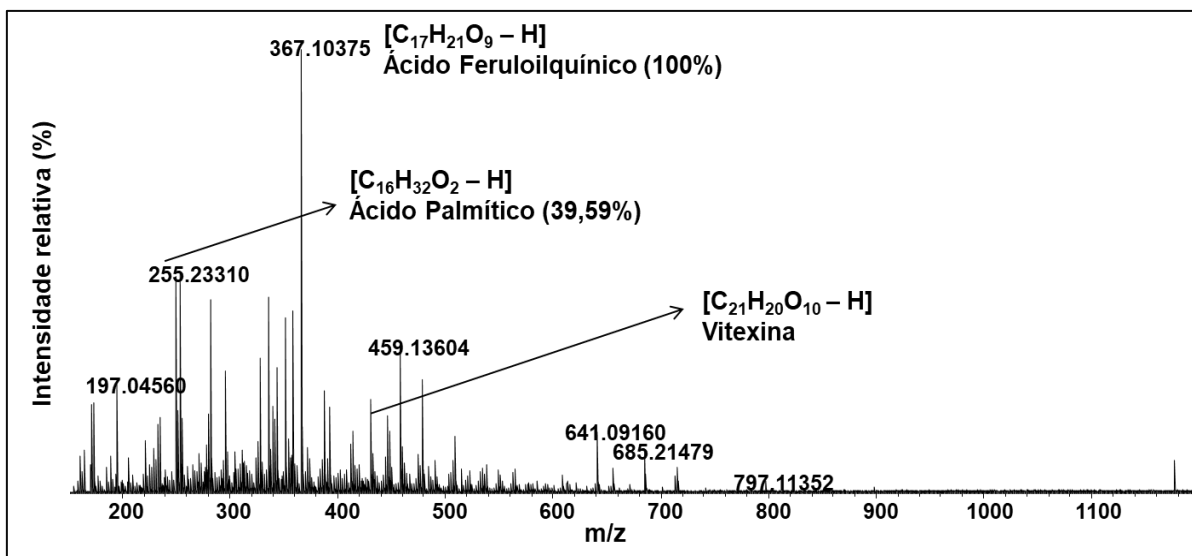


Figura 20. Espectro de massas por ESI (-) da amostra VAcOEt.

O resíduo aquoso da vinhaça apresenta como sinal de maior intensidade relativa o correspondente à sacarose, já em relação aos ácidos graxos e ácidos fenólicos, são ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico/ 9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico (3,58%) e ácido cafeoilquínico (4,88%) (Figura 21 e Tabela 6).

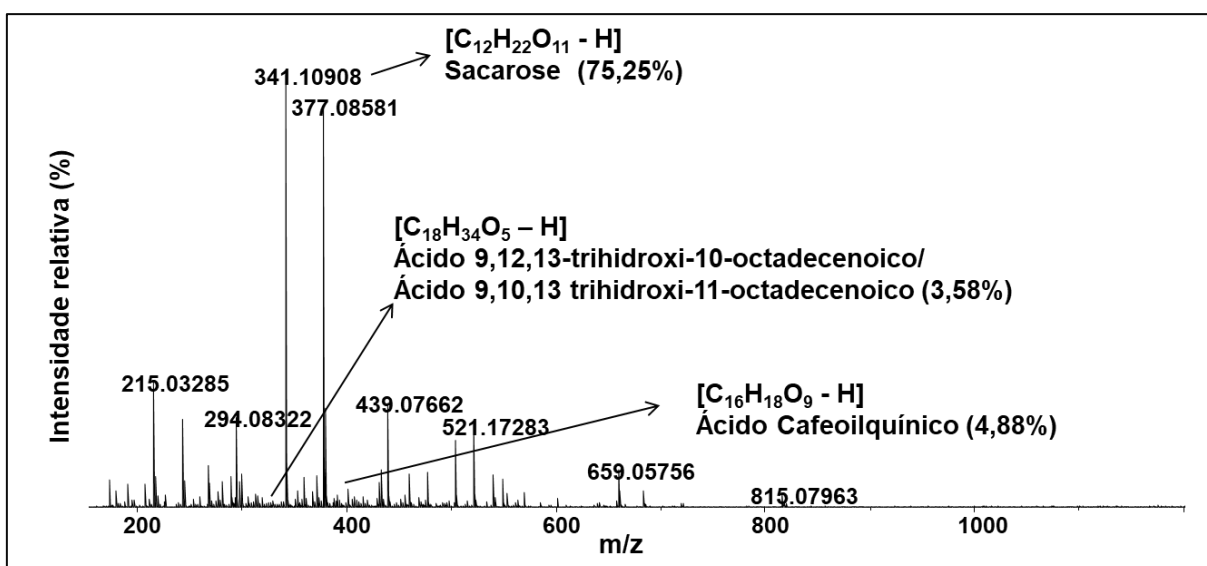


Figura 21. Espectro de massas por ESI (-) da amostra Vaq.

O extrato etanólico do decantado da vinhaça apresenta em sua constituição ácidos

graxos com baixa intensidade de sinal, ácidos fenólicos e flavonoides. Os sinais com maior intensidade relativa em cada classe são ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico/ 9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico (3,58%), ácido feruloilquínico (11,3%) e orientina (17,82%) (Figura 22 e Tabela 6).

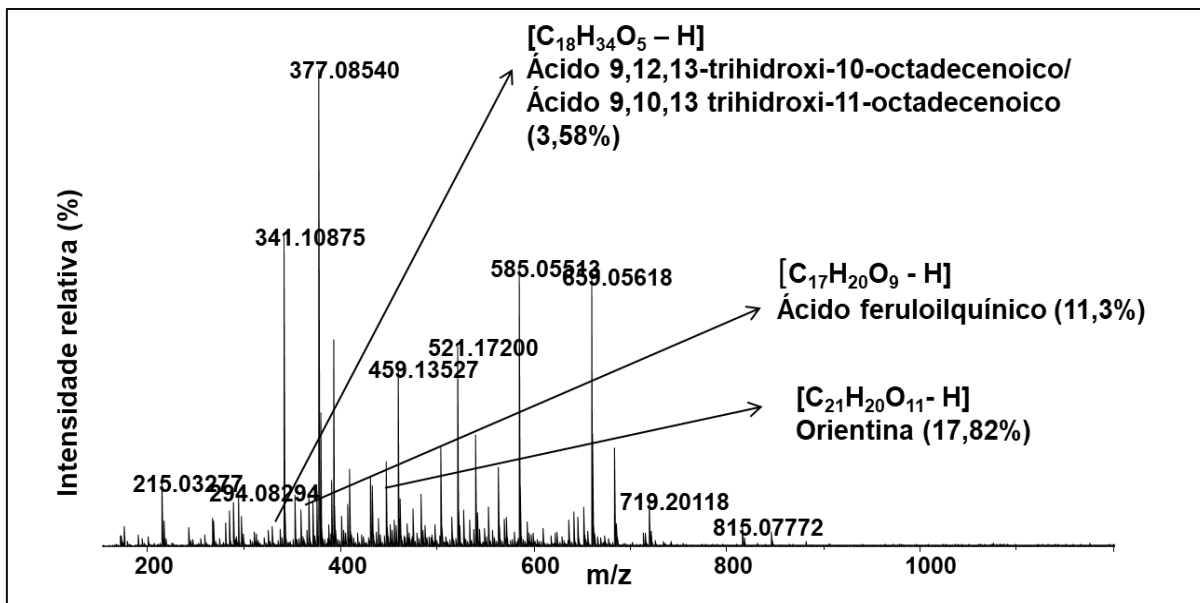


Figura 22. Espectro de massas por ESI (-) da amostra EDV.

O extrato acetônico do decantado da vinhaça não apresentou sinais com intensidade acima de 1% para ácidos graxos, entretanto, foram observados sinais com intensidade relativa mais relevantes para ácidos fenólicos e flavonoides, como ácido feruloilquínico (3,80%) e orientina (2,49%), respectivamente (Figura 23 e Tabela 6).

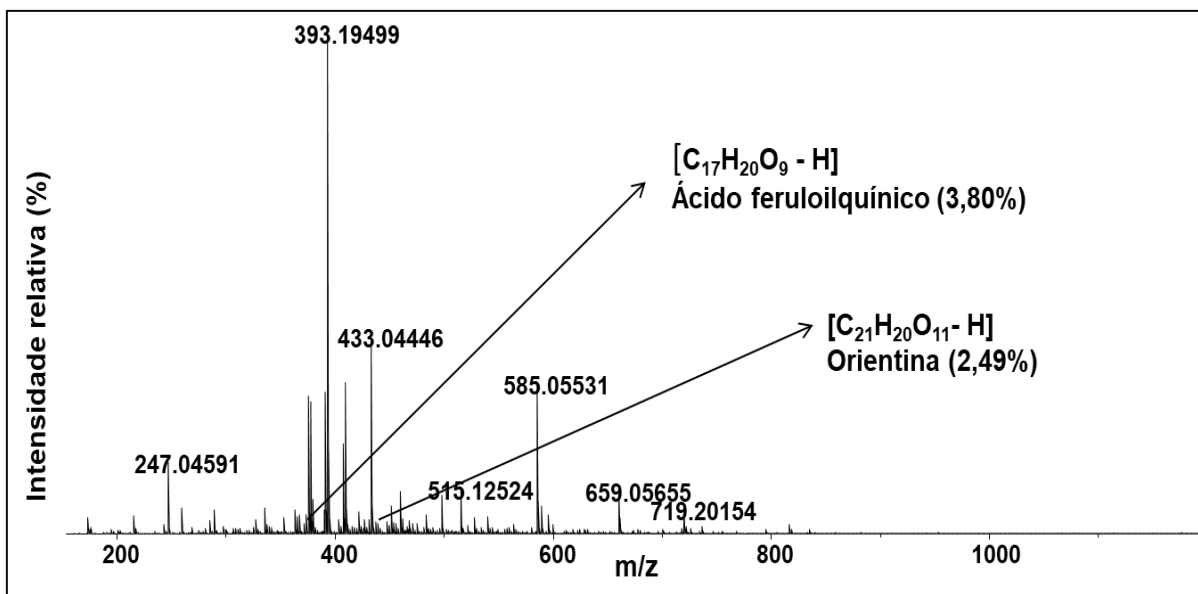


Figura 23. Espectro de massas por ESI (-) da amostra ADV.

Nos extratos da torta de filtro foram verificou-se apenas sinais correspondentes a ácidos graxos. Na maioria das amostras, o ácido graxo com maior intensidade relativa de sinal foi o ácido linoleico (exceto para TFAq), com intensidade de sinal de 89,31% para TFDiCl, e 100,0% para o restante das amostras (Figuras 24-28).

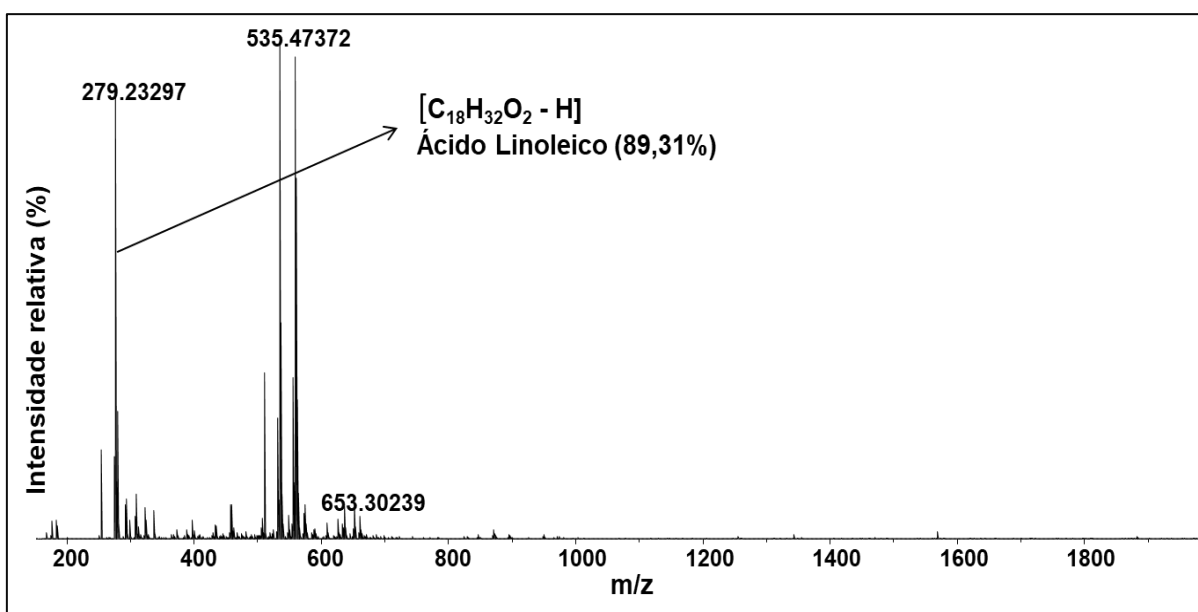


Figura 24. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFDiCl.

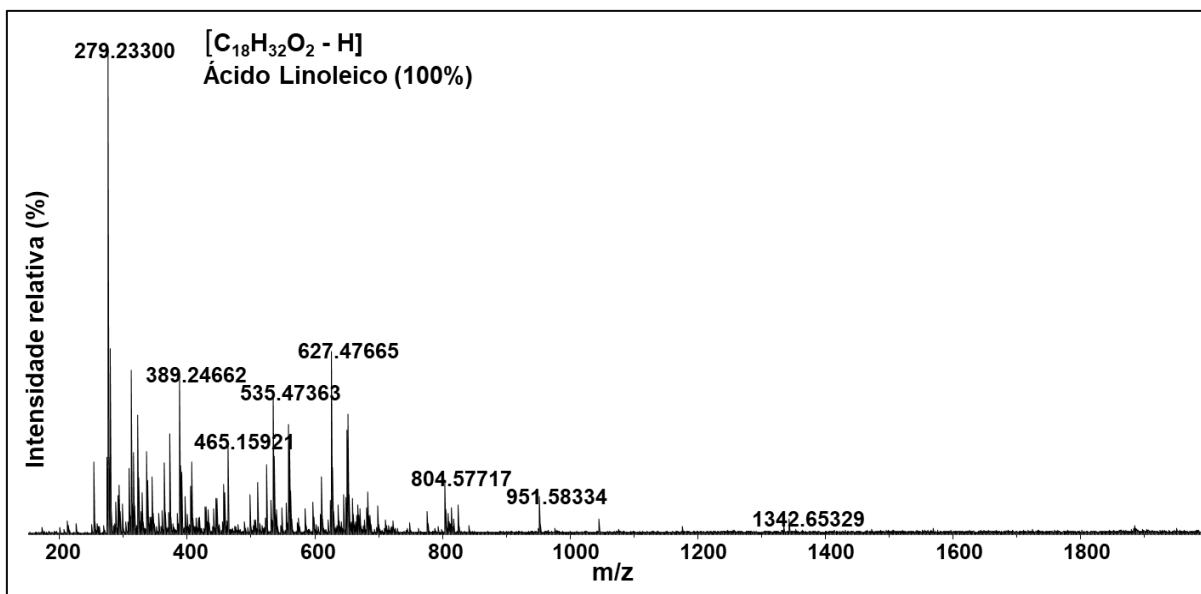


Figura 25. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFEtOH.

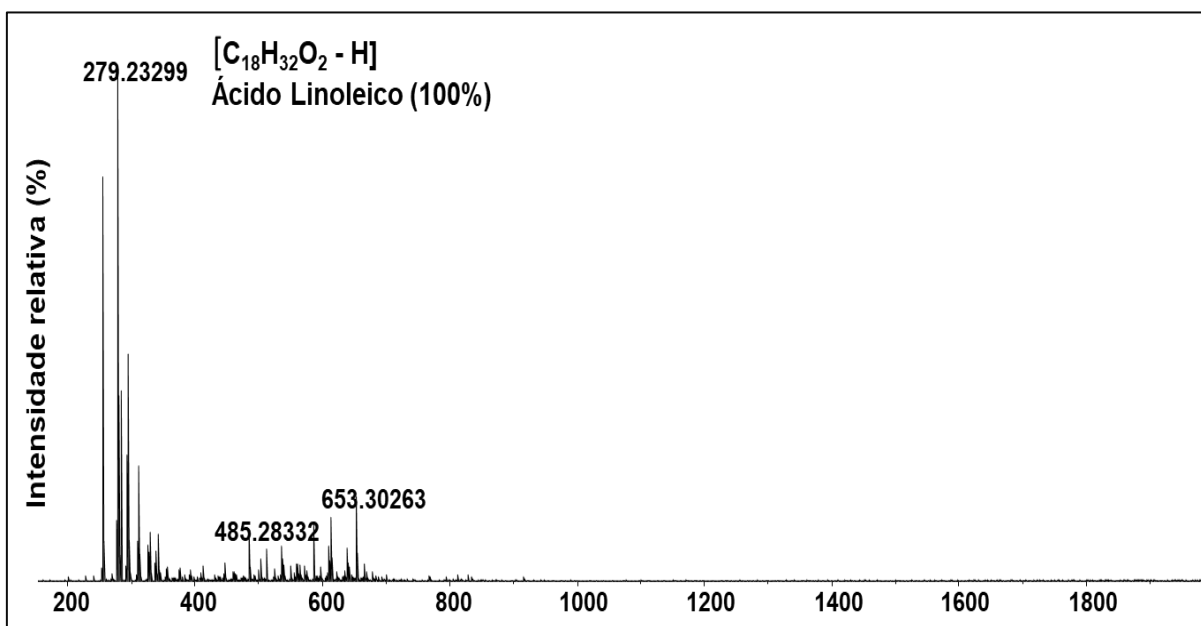


Figura 26. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFMeOH.

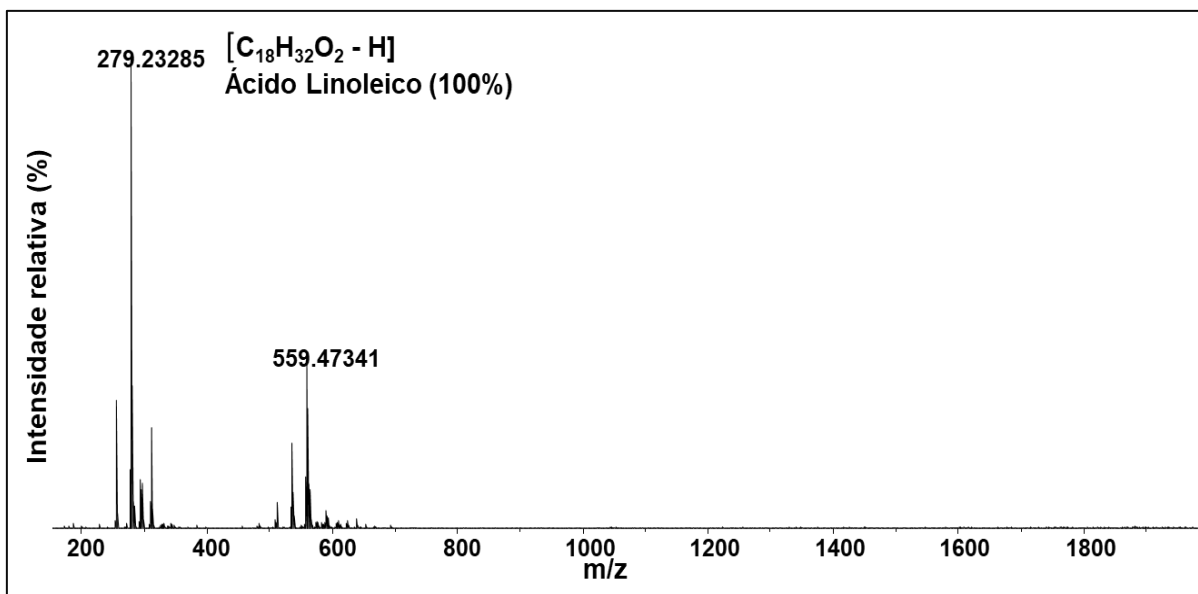


Figura 27. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFSapoH.

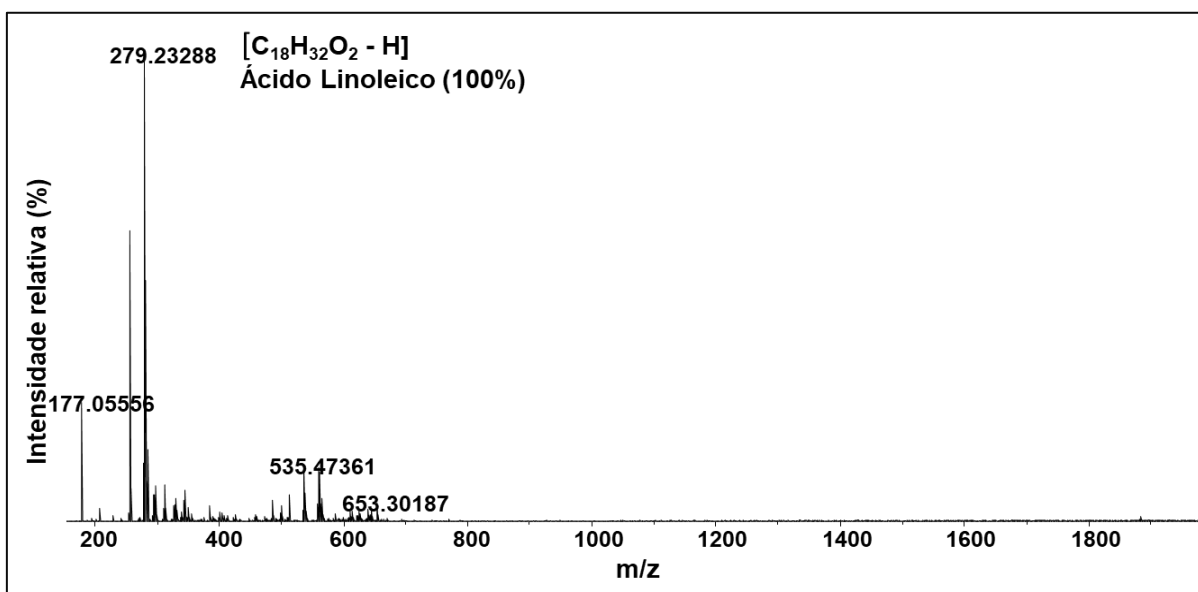


Figura 28. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFSapoD.

A amostra TFAQ apresentou em sua constituição apenas sinais correspondentes aos ácidos graxos insaturados e poli-hidroxiados, 9,12,13-trihidroxioctadecadienoico (12.18%) e 9,12,13-trihidroxioctadecenoico/ 9,10,13 triidroxioctadecenoico (16.52%) (Figura 29 e Tabela 6).

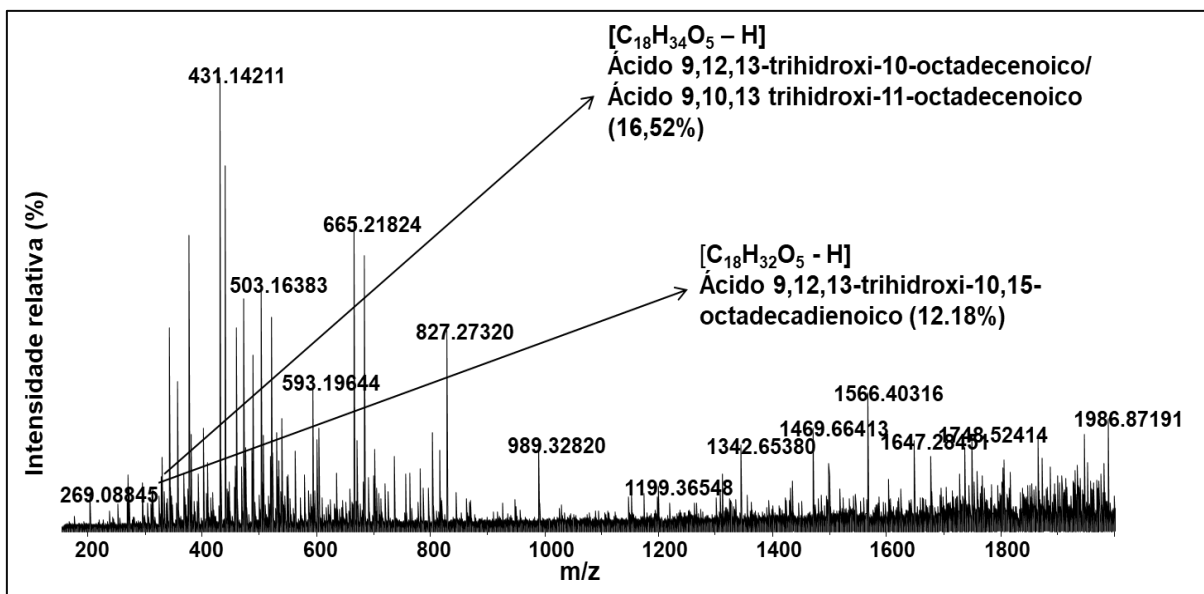


Figura 29. Espectro de massas por ESI (-) da amostra TFAq.

Assim como os extratos da torta de filtro, o extrato metanólico do bagaço apresentou somente sinais de ácidos graxos. Sendo o sinal de maior intensidade relativa correspondente ao ácido palmítico (100,0%) (Figura 30 e tabela 6).

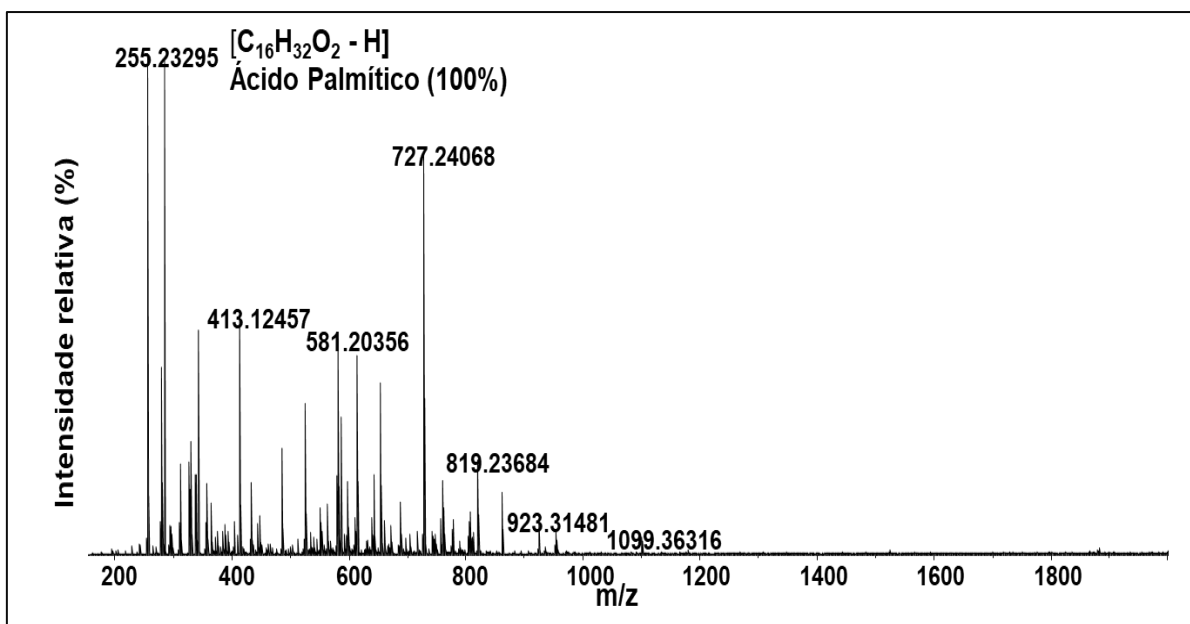


Figura 30. Espectro de massas por ESI (-) da amostra BMeOH.

Enquanto o bagaço saponificado em diclorometano, além de alguns ácidos graxos, como o ácido linoleico (3,58%), também exibiu os ácidos fenólicos *p*-cinâmico (100,0%) e ferúlico (4,89%) (Figura 31 e tabela 6). Tal diferença é justificada pelo método de extração, indicando que adição da base melhora a recuperação dos compostos fenólicos, o que corrobora com os resultados apresentados na seção 4.2 apresenta os teores totais de fenólicos.

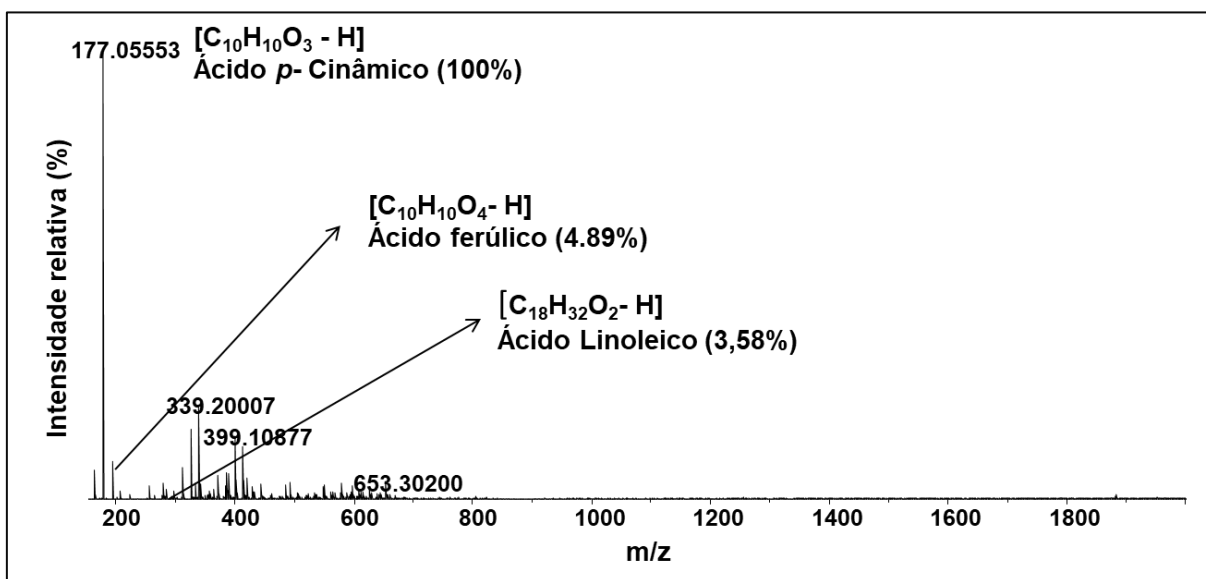


Figura 31. Espectro de massas por ESI (-) da amostra BSapoD.

A presença de ácidos graxos saturados, como palmítico e esteárico, e insaturados, como oleico e linoleico (Figura 32) é descrita na cera que se deposita nos colmos da cana de açúcar (ATTARD *et al.* 2015). Os ácidos, palmítico e linoleico também são descritos na fração em diclorometano das folhas de *Saccharum officinarum*, bem como nas sub-frações deste extrato (GOMES, 2015).

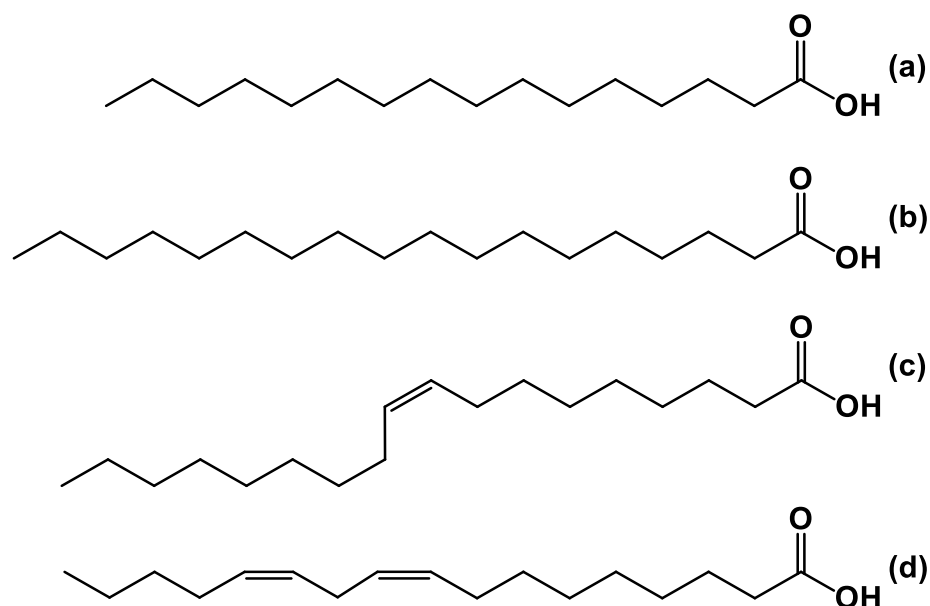
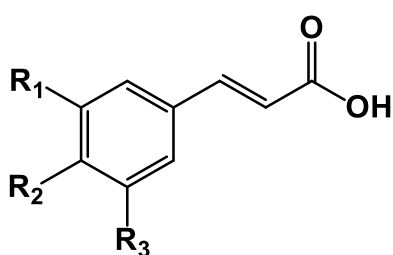
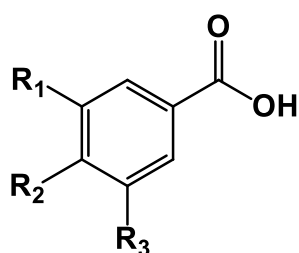


Figura 32. Ácidos graxos identificados em cana-de-açúcar. (a) palmítico; (b) esteárico; (c) oleico e (d) linoleico.

Os ácidos *p*-cumárico, sinápico, cafeico e ferúlico, derivados do ácido cinâmico, foram identificados nas folhas e no caldo de *S. officinarum*, bem como os derivados do ácido benzoico como vanílico, siríngico e *p*-hidroxibenzoico. As estruturas são mostradas na figura 33 (SAMPIETRO *et al.* 2006; SINGH *et al.* 2015; GOMES *et al.* 2016).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Cinâmico	H	H	H
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	OH	H
Cafeico	OH	OH	H
Ferúlico	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Sinápico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Benzoico	H	H	H
<i>p</i> -hidroxibenzoico	H	OH	H
Vanílico	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Siríngico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

Figura 33. Compostos fenólicos identificados em amostras de cana-de-açúcar ou em produtos obtidos a partir da planta.

Os isômeros do ácido cafeoilquínico e isômeros do ácido feruloilquínico são descritos em folhas de *S. officinarum*, são apresentados na figura 34 (SILVA, 2012).

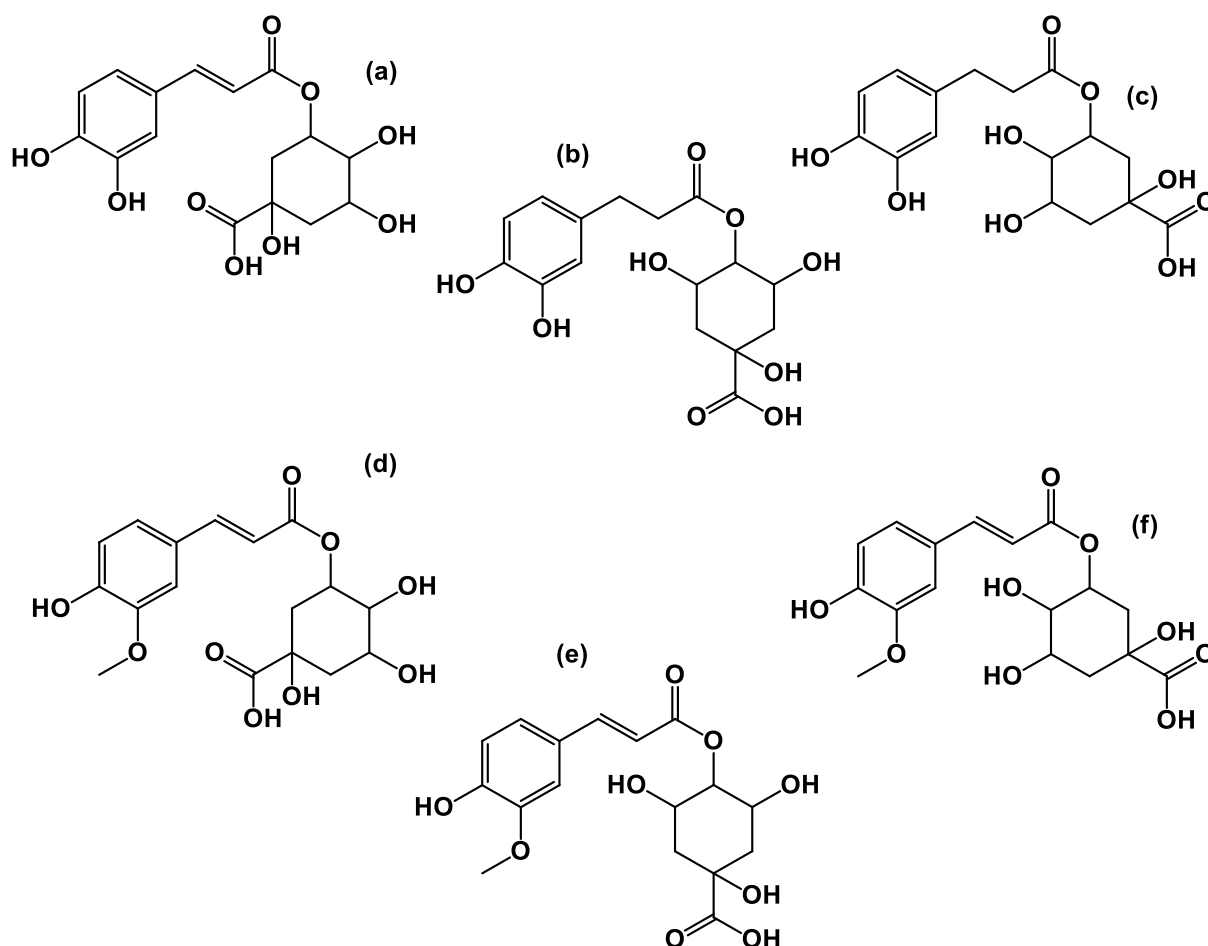


Figura 34. Isômeros do ácido cafeoilquínico e isômeros do ácido feruloilquínico identificados em cana-de-açúcar. (a) 3-cafeoilquínico; (b) 4-cafeoilquínico; (c) 5-cafeoilquínico; (d) 3-feruloilquínico; (e) 4-feruloilquínico e (f) 5-feruloilquínico.

Aproximadamente 50 flavonoides foram identificados em folhas, bagaço e caldo da cana-de-açúcar, entre eles, orientina, vitexina, schaftosideo e isoshaftosideo, (COLOMBO, 2006; VILA *et al.* 2007; GOMES, 2015). A apigenina 6-C-glucosil-8-C-glucosídeo foi relatada em garapa, as estruturas são apresentadas na Figura 35 (DUARTE-ALMEIDA *et al.* 2006).

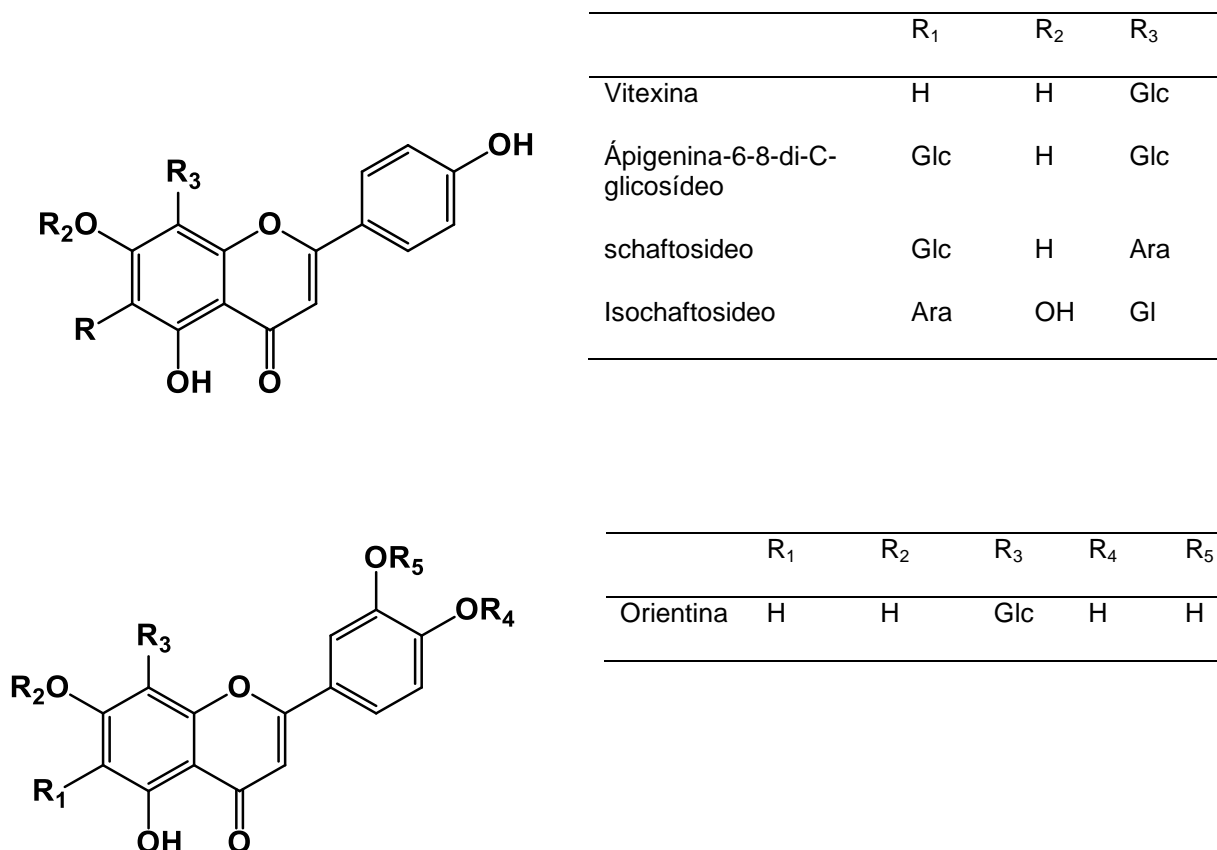


Figura 35. Flavonoides identificados em cana-de-açúcar. Sendo, Ara: arabinose e Glc: glicose.

#### 4.1.1.1. Identificação de oxilipinas por ESI (-) MS/MS em *Saccharum ssp.*

Os experimentos em DIC dos íons pseudomoleculares  $[M-H]^-$  327,21796 ( $C_{18}H_{31}O_5$ ) e 329,23355 ( $C_{18}H_{33}O_5$ ), respectivamente (Figura 36), levaram a proposição dos ácidos graxos insaturados poli-hidroxilados, 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico, para o primeiro e 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico e 9,10,13-trihidroxi-11-octadecenoico para o segundo (Figuras 37).

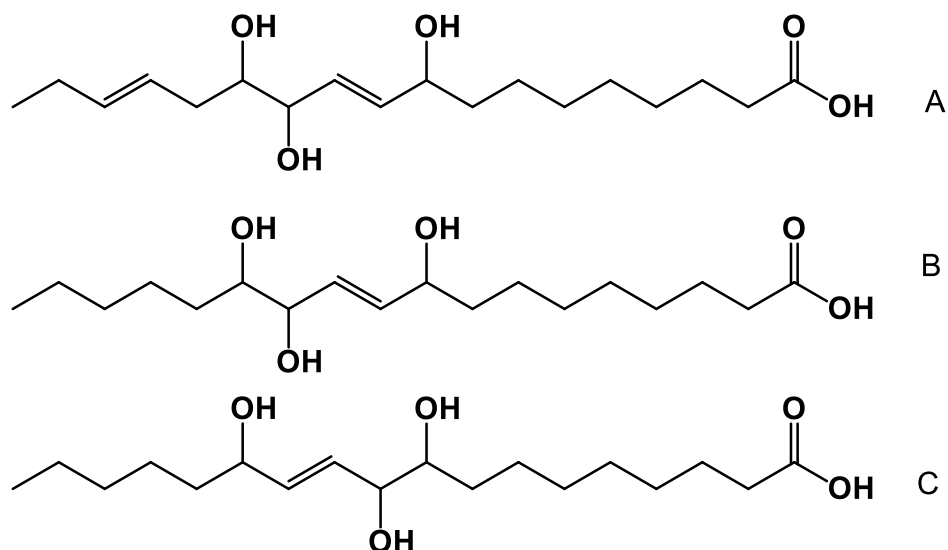


Figura 36. Estruturas das oxilipinas, (A) ácido 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico, (B) ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico e (C) ácido 9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico.

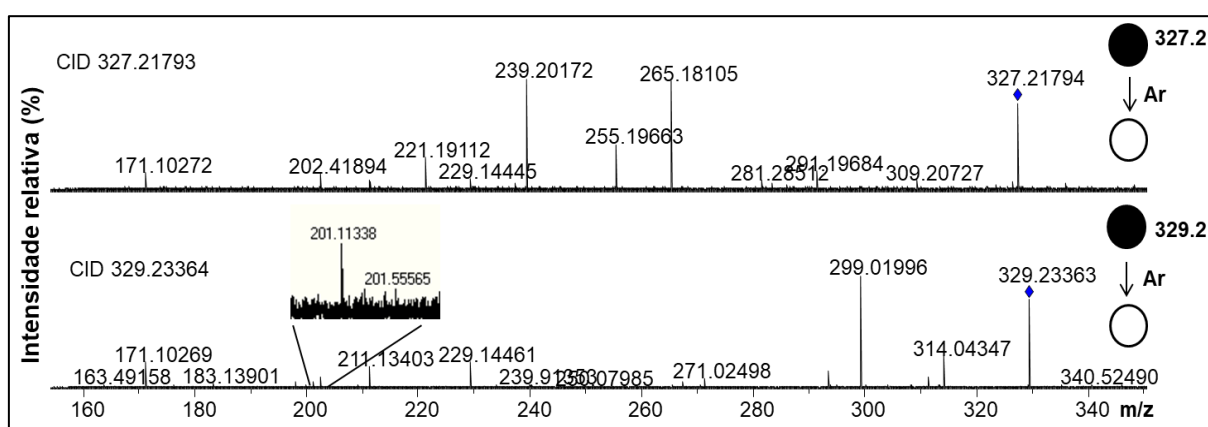


Figura 37. Espectros de ESI (-) -MS/MS (DIC) para os íons de  $m/z$  327 e  $m/z$  329.

No trabalho de BIN e PETERSON (2016), o principal fragmento do ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico é o  $m/z$  211, também observado nos experimentos de DIC (Figura 37). MORAES (2017) relata em experimentos de HR-ESI(-) MS/MS, para o íon 329, fragmentos de  $m/z$  229 e 171, também observados na figura 37, indicando que são sinais característicos da quebra de ligação  $\alpha$  à hidroxila. Tais informações corroboram com a proposta apresentada neste estudo.

Em seu estudo, BIN e PETERSON (2016), descrevem a presença de um isômero de posição do ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico. O ácido 9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico, com fragmento característico ( $m/z$  201), foi também observado na figura 37, o que sugere que exista uma mistura destas substâncias na amostra. Assim como no trabalho de HOSSAIN *et al.* (2010), a identificação de isômeros foi uma limitação da análise por DIC, nesse contexto, o isolamento, purificação e aplicação de ressonância magnética nuclear seria conveniente.

Nas figuras 38-39 estão representadas as propostas de fragmentação dos íons pseudomoleculares  $m/z$  327 e  $m/z$  329, respectivamente e na figura 40 é apresentado a proposta de fragmentação do íon 329 gerando  $m/z$  201.

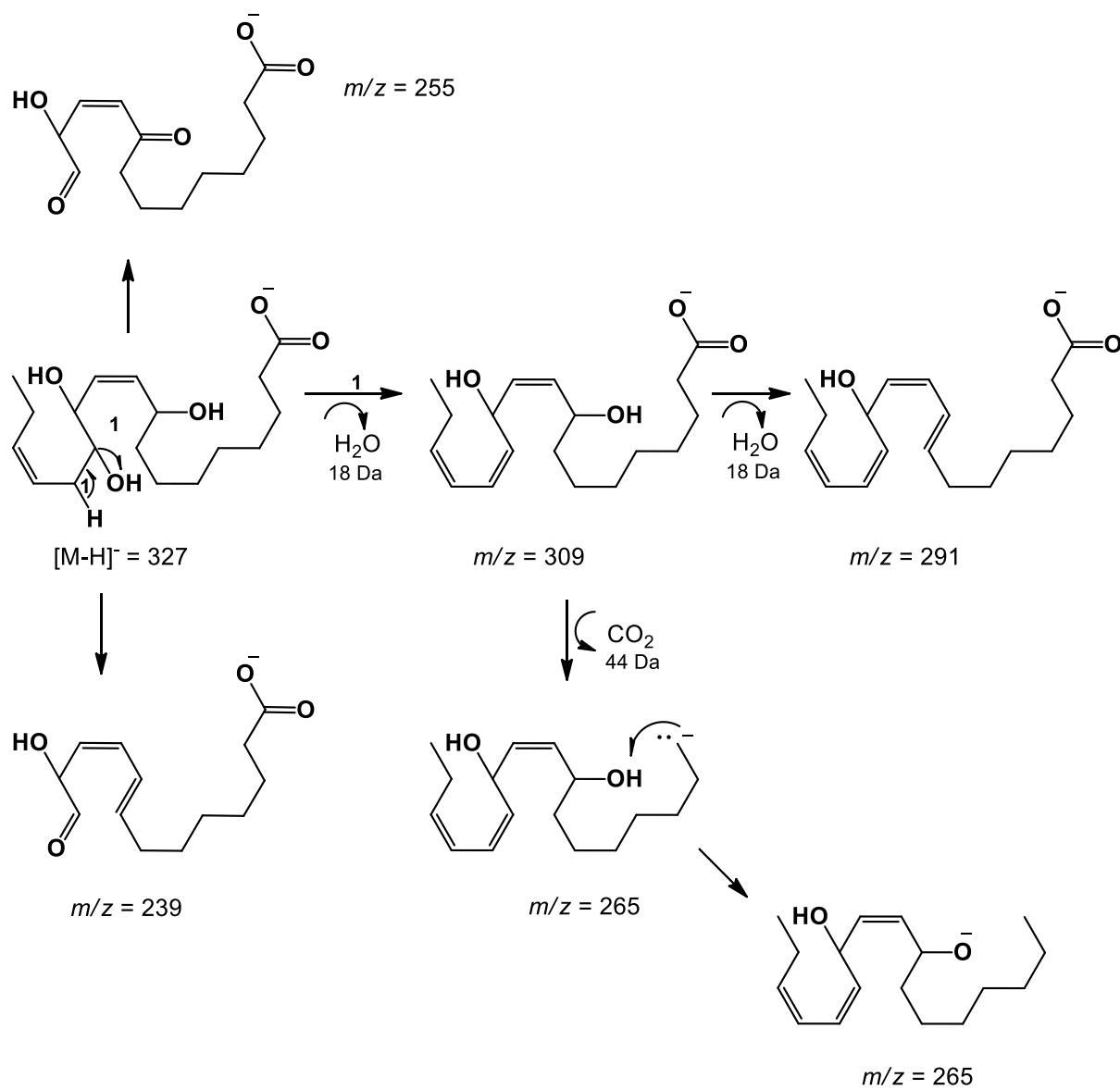


Figura 38. Proposta de fragmentação do íon 327.

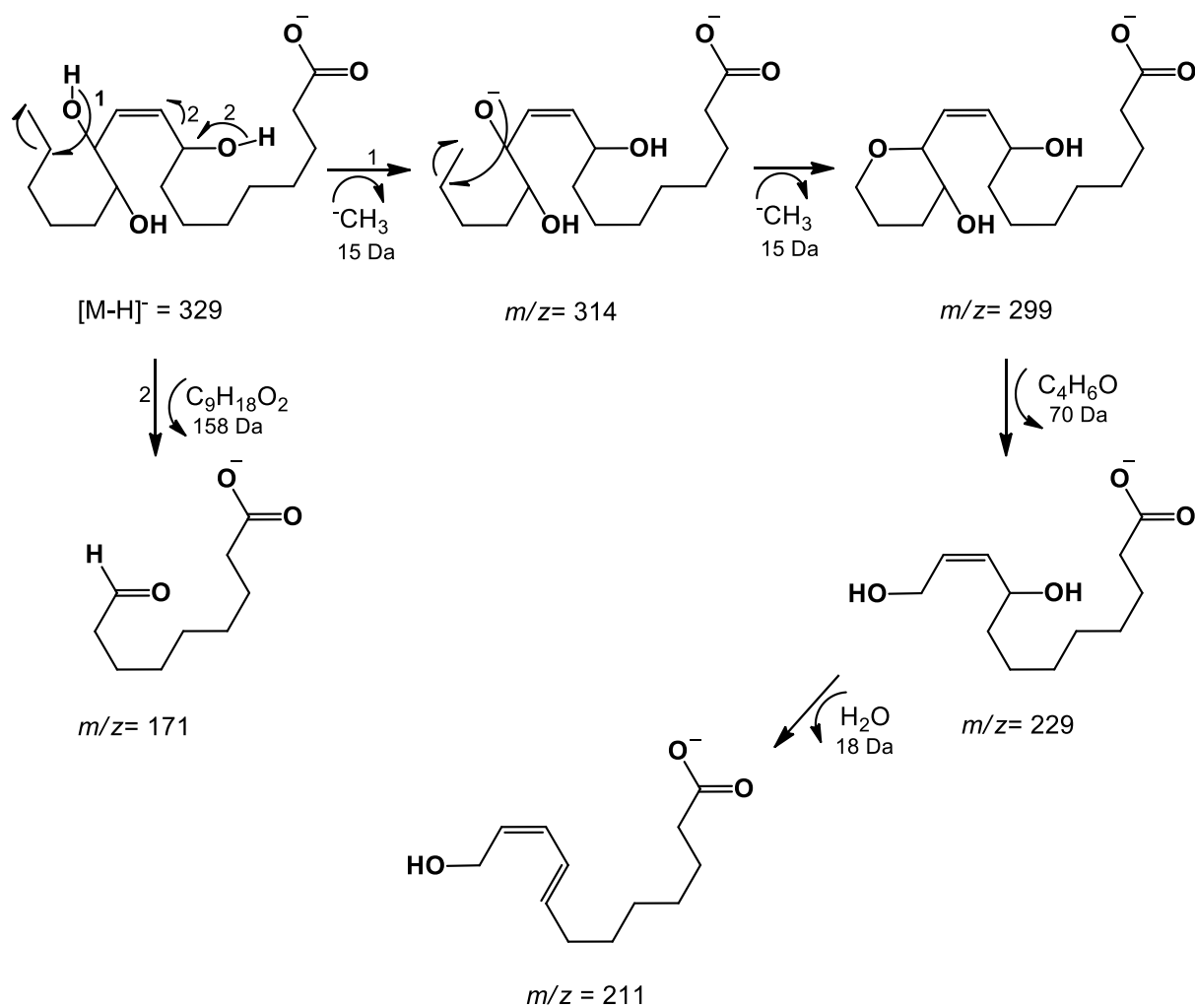


Figura 39. Proposta de fragmentação do íon 329.

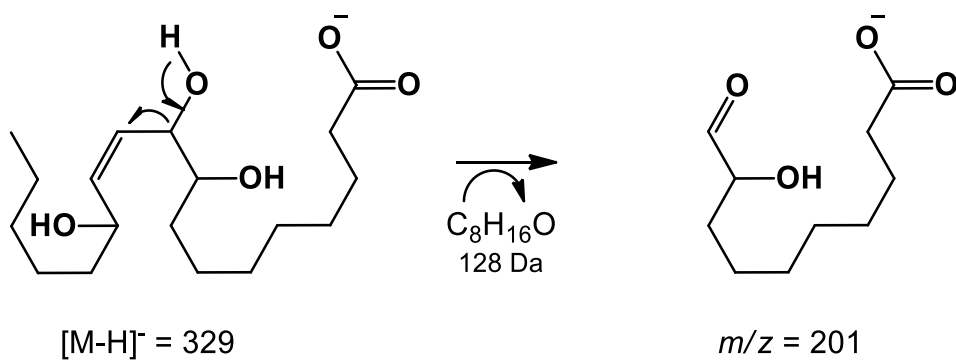


Figura 40. Proposta de fragmentação do íon 329 gerando fragmento  $m/z$  201.

Os ácidos, 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico;9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico e 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico não foram descritos em *Saccharum ssp.* Entretanto HONG e OH (2012) isolaram o ácido pinélico (9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico) em *Triticum L.*, espécie pertencente à família Poaceae e BIN e PETERSON (2016) descrevem sua presença em pão integral juntamente com ácido 9,10,13 triidroxi-11-octadecenoico.

O ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico e o ácido 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico foram isolados de *Cyperus rotundus* - mesma ordem e classe que *Saccharum ssp.* (SHIN *et al.*, 2015), *Lonicera caprifolium* (KIM *et al.* 2009), *Salsola tetrandra* (OUESLATI *et al.* 2006) e *Vicia faba* (WALTERS *et al.* 2006).

Os isômeros ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico e ácido 9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico são descritos em *Urtica dioica* (GANSSER e SPITELLER, 1995) e em caldo de cultura de *Pseudomonas* incubadas com ácido linoleico (MARTIN-ARJOL *et al.* 2010).

O ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico e ácido 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico são descritos com relevante atividade anti-inflamatória (SHIN *et al.* 2015) e antifúngica (WALTERS *et al.* 2006). O ácido 9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico também é relatado com interessante atividade antifúngica (MARTIN-ARJOL *et al.* 2010).

Este é o primeiro relato da presença destas oxilipinas em cana-de-açúcar.

#### **4.1.2. Análise de ácidos graxos e compostos fenólicos por CG-EM**

As partições e/ou extratos dos resíduos, exceto vinhaça bruta, resíduo aquoso da vinhaça e extrato aquoso da torta de filtro, foram derivatizadas com diazometano ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) e conduzidos à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os espectros de massas foram comparados com dados de fragmentação descritos em literatura e da biblioteca NIST 11 do equipamento. Foram consideradas aceitáveis propostas nos quais o índice similaridades fosse

maior ou igual a 90%, também são consideráveis satisfatórias proposições cujo índice de Kovats seja igual ou próximo em 5 unidades aos descritos em literatura.

Foram identificados 11 compostos na forma de ésteres metílicos, em razão ao prévio processo de metilação com  $\text{CH}_2\text{N}_2$ . Foram considerados compostos majoritários aqueles constituintes com concentração relativa maiores ou iguais a 5%. Os espectros de fragmentação de cada composto, bem como sua estrutura são mostrados nas figuras A1 – A11 (em anexo).

Na tabela 7, é mostrado a identificação dos compostos, composto proposto, tempo de retenção médio, porcentagem de similaridade de acordo com a NIST, índice de Kovats, índice de Kovats descrito em literatura, bem como sua concentração relativa nas respectivas amostras.

Tabela 7. Análise por CG-EM das amostras. A identidade dos compostos foi sugerida por comparação dos espectros de massas com espectros das bibliotecas NIST 11

I D E N T	Composto	Tempo de retenção	Similaridade (NIST)	Índice de kovats	Índice de Kovats Literatura	Intensidade relativa (%)											
						V Hex	V DiCl	V AcOEt	E D V	A D V	TF DiCl	TF EtOH	TF MeOH	TF SapoH	TF SapoD	B MeOH	B SapoD
1	Éster do ácido <i>p</i> -metoxibenzóico	8.001	86.5	1386	1386	-	-	5.48		-	-	-	-	-	-	-	-
2	Éster ácido 3,4-dimetoxibenzóico	9.750	91.9	1597	1599	1.17	9.98	40.73	4.86	1.78	-	2.55	-	-	-	1.07	-
3	Éster ácido <i>p</i> -metoxi-cinâmico	10.502	93.9	1687	1692	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65.44
4	Éster ácido Mirístico	10.798	84.4	1719	1718	1.14	-	-	1.1	-	0.97	0.41	1.0	1.57	1.12	1.47	-
5	Éster ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico	10.876	92.3	1727	1678	0.84	13.53	23.05	2.94	-	-	-	-	-	-	1.38	1.26
6	Éster ácido 3,4-dimetoxicinâmico	12.557	95.0	1900	1873	-	-	-	0.18	-	-	-	-	-	-	-	9.70
7	Éster ácido Palmitoleico	12.749	91.5	1892	1892	-	-	-	5.64	-	-	-	-	-	0.35	-	-
8	Éster ácido Palmítico	13.045	91.0	1915	1915	15.85	12.02	2.57	28.03	9.23	56.23	23.84	42.85	29.44	31.8	41.08	4.86
9	Éster ácido Linoleico	15.603	89.9	2089	2092	-	-	-	3.5	-	-	3.67	16.76	33.24	33.57	3.79	6.24
10	Éster ácido Oleico	15.676	93.3	2094	2095	2.19	3.59	-	5.98	-	4.71	4.64	15.09	24.66	25.96	-	-
11	Éster ácido Estearico	16.236	90.5	2118	2119	8.94	3.35	-	10.63	2.36	5.38	2.30	7.14	5.03	4.39	8.41	-

Na análise por CG-EM, a partição em hexano da vinhaça (Figura 41) apresentou como compostos majoritários o ácido palmítico (15.85%) e ácido esteárico (8.94%) (Tabela 7).

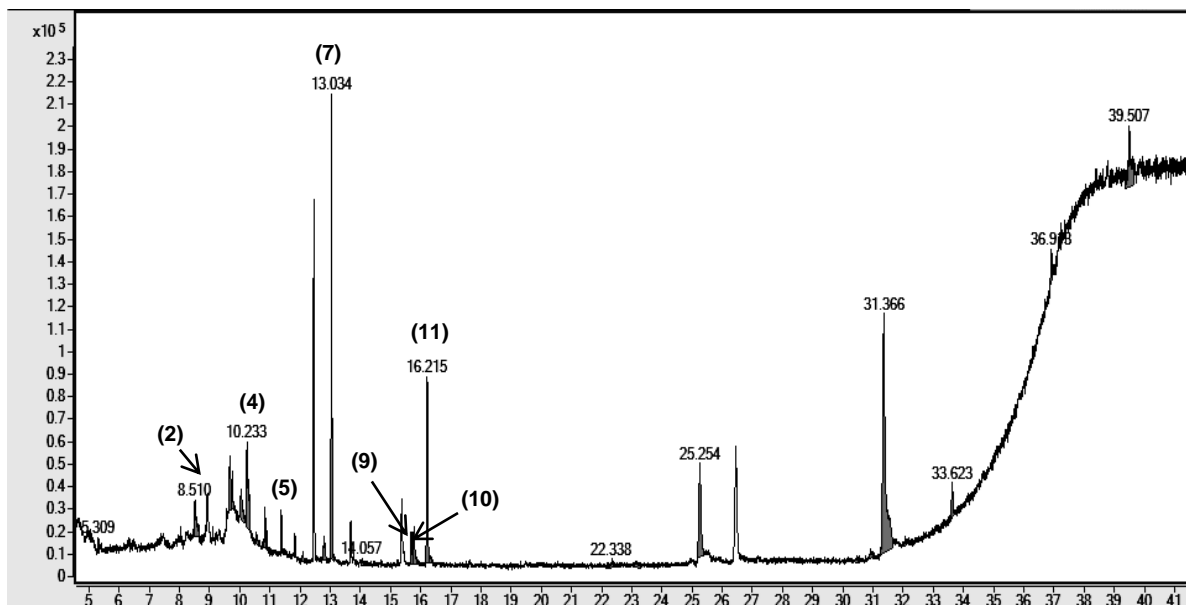


Figura 41. Cromatograma em fase gasosa da amostra VHex.

A partição em diclorometano da vinhaça apresentou um cromatograma (Figura 42) referente a uma mistura contendo ácidos graxos e compostos fenólicos. Foram identificados como compostos majoritários o ácido palmítico, ácido 3,4-dimetoxibenzoico e o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico. A mistura é formada por cerca de 19% de ácidos graxos e 23% de compostos fenólicos (Tabela 7).



O cromatograma do extrato em etanol do decantado da vinhaça (Figura 44) apresenta uma mistura de ácidos graxos, correspondente a aproximadamente 50% da amostra. O ácido palmítico e o ácido esteárico são os compostos majoritários, enquanto em menores concentrações estão o ácido palmitoleico e o ácido 3,4-dimetoxibenzoico (Tabela 7).

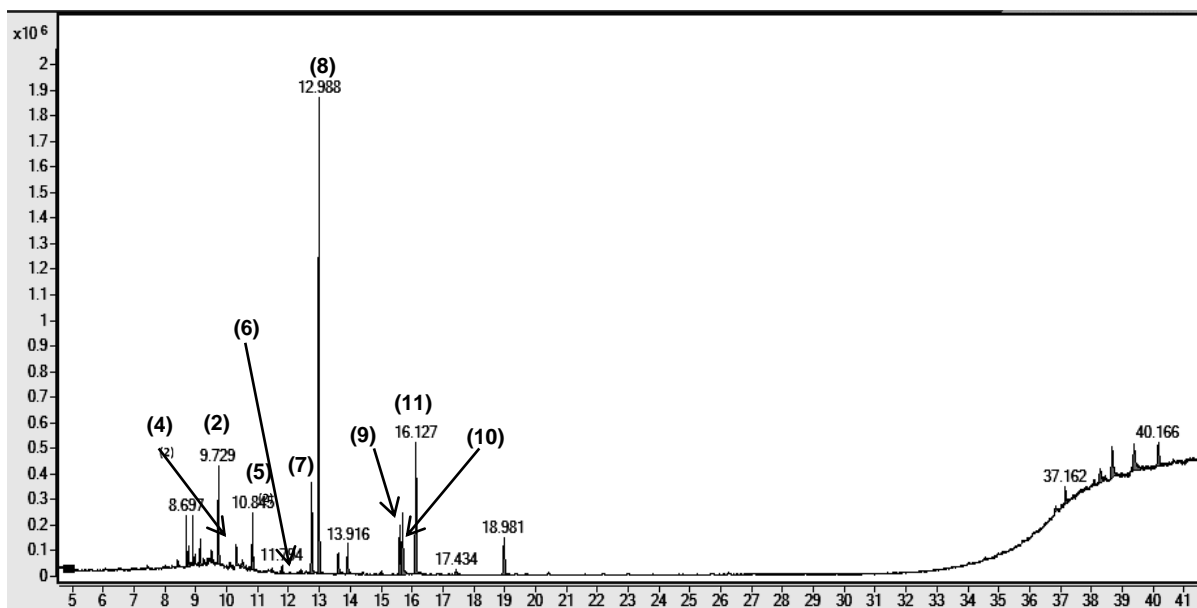


Figura 44. Cromatograma em fase gasosa da amostra EDV.

O extrato em acetona do decantado da vinhaça (Figura 45), revela em seu cromatograma como composto em maior proporção o ácido palmítico (9,23%) (Tabela 7).

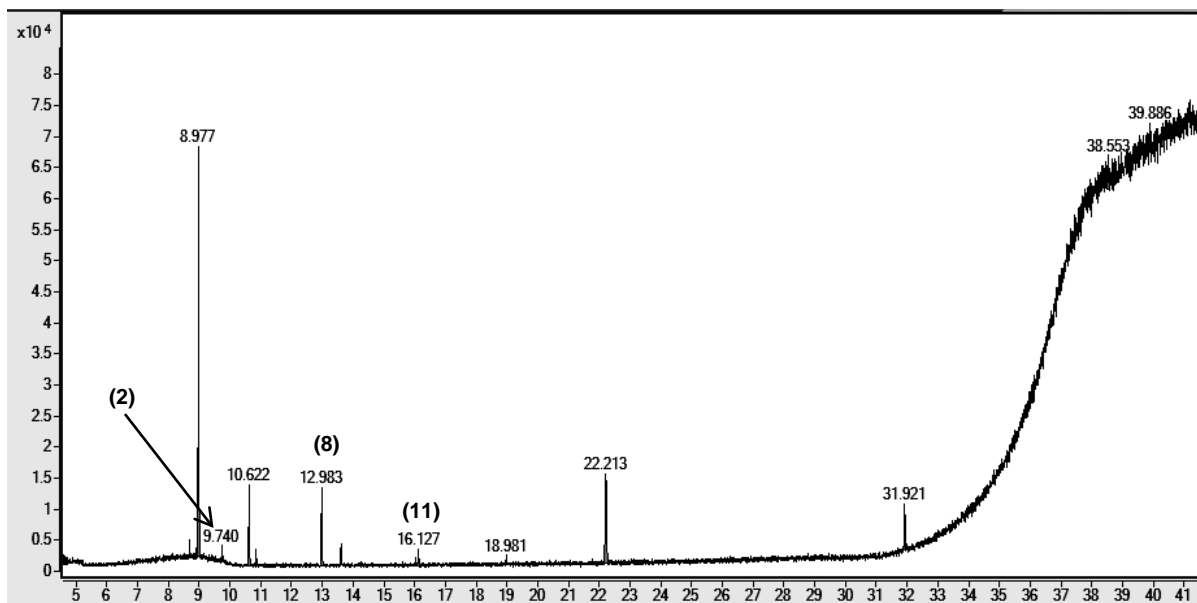


Figura 45. Cromatograma em fase gasosa da amostra ADV.

A análise por CG-EM dos extratos da torta de filtro (Figura 46-50 e tabela 7) apresentou cromatogramas referentes a um perfil de mistura de ácidos graxos, com tempo de retenção variando de 13-16 min, próximo aos encontrados por ZHANG e LIU, (2015), para uma mistura contendo essa classe de compostos. A mistura de compostos apolares observadas nesta análise corrobora com os resultados na seção 4.1.1.

O ácido palmítico é a substância majoritária das amostras TFDiCl (53,23%), TFEtOH (23,84%) e TFMeOH (42,85 %), enquanto em menores concentrações estão ácido linoleico, ácido oleico e ácido esteárico, os cromatogramas são mostrados nas figuras 46, 47 e 48, respectivamente.

As amostras TFSapoH e TFSapoD são constituídas principalmente pelo ácido linoleico, ácido palmítico e oleico. A porcentagem de ácidos insaturados nas amostras é maior que 50%, os cromatogramas são apresentados nas figuras 49 e 50, respectivamente.

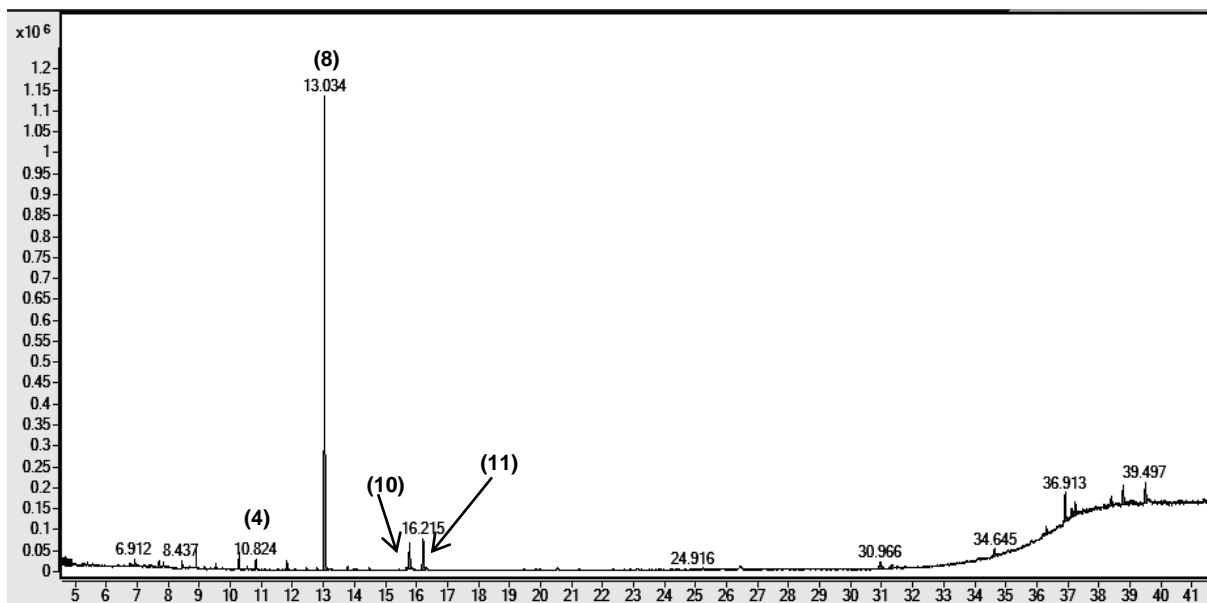


Figura 46. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFDiCl.

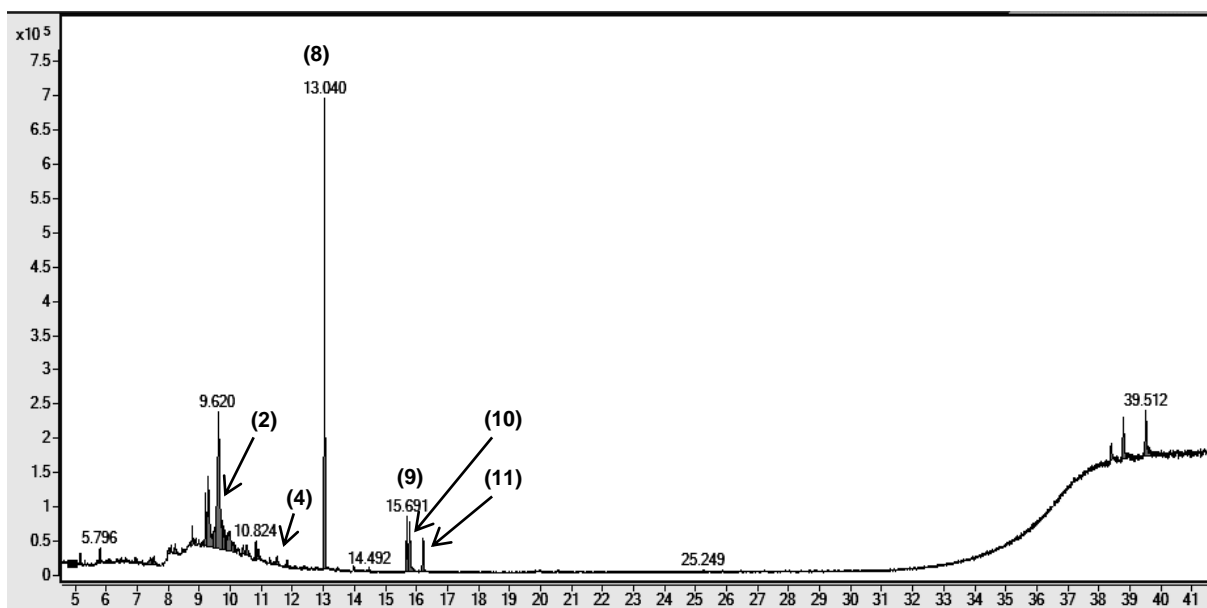


Figura 47. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFEtOH.

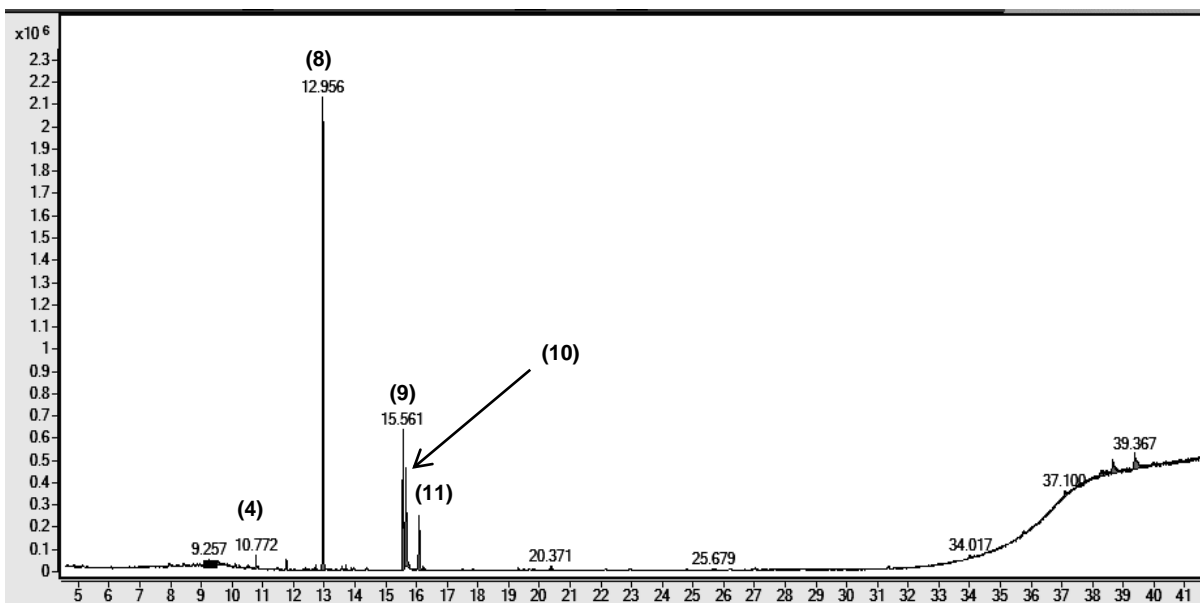


Figura 48. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFMeOH.

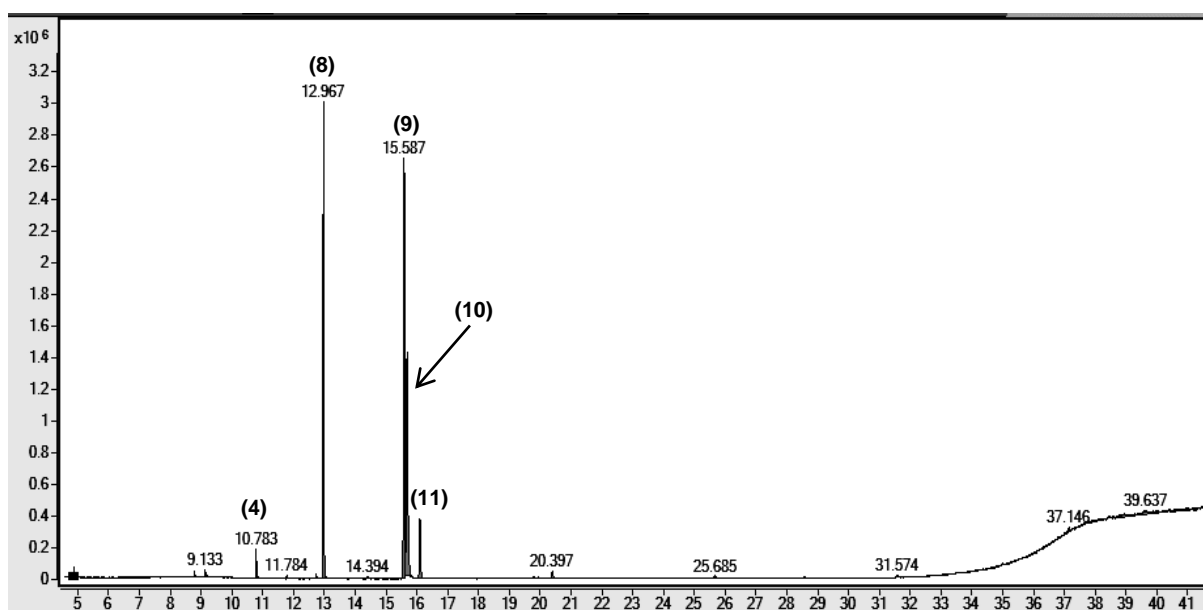


Figura 49. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFSapOH.

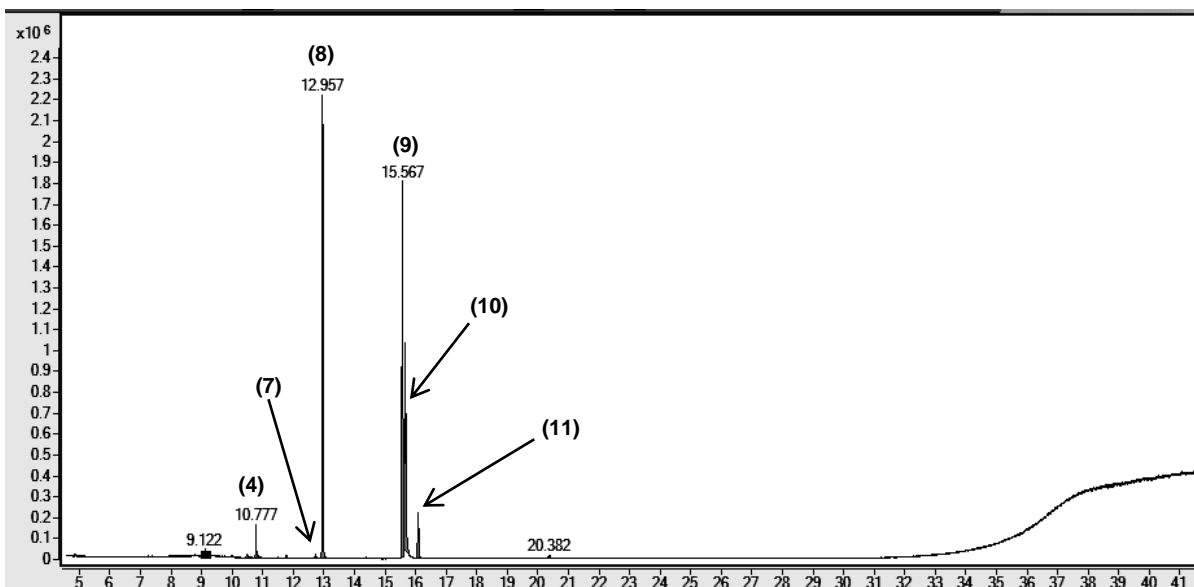


Figura 50. Cromatograma em fase gasosa da amostra TFSapOD.

O cromatograma do extrato metanólico do bagaço (Figura 51) apresenta maior proporção de ácidos graxos, com destaque para o ácido palmítico cuja concentração corresponde a 42% da amostra, e em menor proporção tem-se o ácido esteárico (Tabela 7).

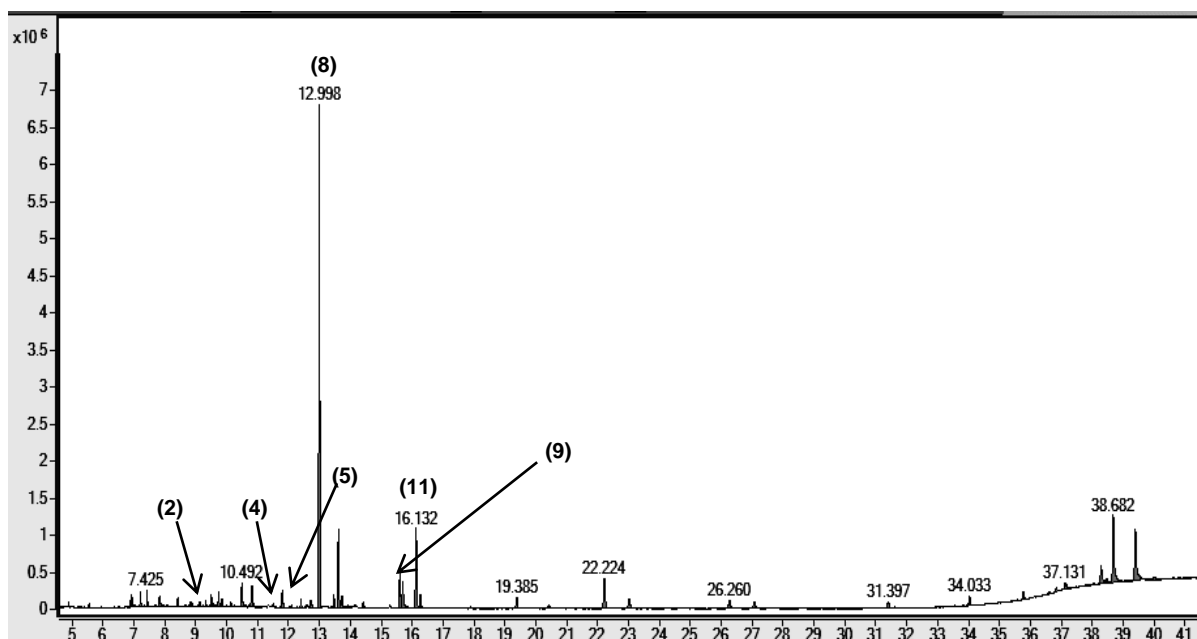


Figura 51. Cromatograma em fase gasosa da amostra BMeOH.

O extrato saponificado do bagaço revela um cromatograma (Figura 52) com maior proporção de ácidos fenólicos. O composto majoritário da mistura é o ácido *p*-

metoxicinâmico, correspondente a 62% da composição da amostra, e em menores concentrações, estão o ácido 3,4-dimetoxicinâmico e ácido linoleico (Tabela 7).

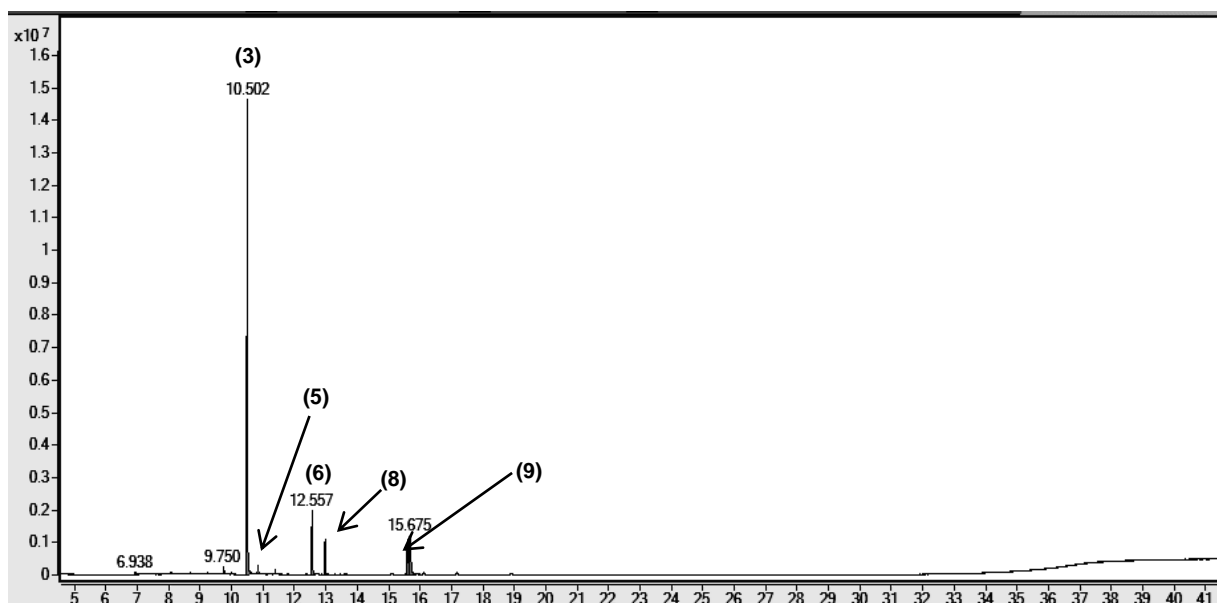


Figura 52. Cromatograma em fase gasosa da amostra BSapoD.

Segundo as análises de CG-EM das partições e/ou extratos dos resíduos, observa-se um perfil químico diferente em cada amostra. Os ácidos graxos identificados são descritos em *S. officinarum* (ATTARD *et al.* 2015; GOMES, 2015). Os compostos fenólicos detectados, derivados dos ácidos cinâmico e benzoico, foram relatados em cana-de-açúcar (SAMPIETRO *et al.* 2006; SINGH *et al.* 2015; GOMES, 2015).

#### 4.2. Determinação dos teores de fenóis totais das diferentes frações e extratos dos resíduos

Os extratos e frações dos resíduos foram conduzidos ao ensaio para determinação do teor de fenólicos totais pelo método de quantificação espectrofotométrica com o reagente Folin-Ciocalteu.

O método consiste na redução do molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu) por agentes redutores como os compostos fenólicos. Estes formam

os denominados tungstênio azul e molibdênio azul, no qual a intensidade de coloração possibilita a determinação da concentração das substâncias redutoras (SOUZA *et al.* 2007; LIMA *et al.* 2017).

De acordo com DUARTE-ALMEIDA (2006), o teor de fenólicos totais do caldo-de-cana é de 160 µg EAC/L, onde foram identificados os flavonoides: derivados de luteolina e tricina, e aepiginina, já os ácidos fenólicos observados foram: sinápico, cafeico e isômeros de ácido clorogênico.

O aumento da concentração de fenólicos no processo de fermentação é descrito nos trabalhos de GOMES (2015) e GOMES *et al.* (2016), que observaram maiores teores de ácidos fenólicos e flavonoides nas frações metanólicas fermentadas do caldo-de-cana em comparação com as frações metanólicas não fermentadas.

Os resultados para a vinhaça na tabela 8 mostram que o processo de fermentação do caldo-de-cana e posterior destilação não promovem a perda dos compostos fenólicos, assim como no trabalho de CADERBY *et al.* (2013), que avaliou três amostras diferentes de vinhaça e obteve concentração de fenólicos totais de  $2,9 \pm 0,2$ ,  $2,8 \pm 0,3$ , e  $3,9 \pm 0,1$  g/L equivalentes de ácido clorogênico (EAC). Também sugeriu que as diferenças encontradas nas concentrações dos fenólicos em diferentes usinas e na mesma usina em momentos de coleta distintos são ocasionadas por variações nas condições climáticas das culturas de cana-de-açúcar (CADERBY *et al.* 2013).

**Tabela 8. Teores de substâncias fenólicas expressas em mg EAC/g nos resíduos agroindustriais: vinhaça, torta de filtro e bagaço.**

Identificação da amostra	Média (mg/g de extrato)
VBruta	42,15 ± 2,05
VHex	40,29 ± 2,38
VDiCl	123,51 ± 8,35
VAcOEt	244,78 ± 8,49
VAq	32,93 ± 1,88
EDV	87,37 ± 0,64
ADV	83,99 ± 5,80
TFAq	25,34 ± 4,76
TFDiCl	23,52 ± 1,88
TFEtOH	31,00 ± 1,20
TFMeOH	43,84 ± 3,88
TFSapoH	16,15 ± 0,68
TFSapoD	198,11 ± 31,06
BMeOH	106,45 ± 8,54
BSapoD	389,88 ± 27,68

As concentrações de fenólicos totais relativamente baixas na torta de filtro corroboram com os resultados apresentados nas seções 4.1.1 e 4.1.2, que demonstram que sua constituição é rica em ácidos graxos. A extração alcalina com posterior partição líquido-líquido em solvente diclorometano demonstrou uma maior eficiência na extração de compostos fenólicos para esse resíduo. Segundo LIYANA-PATHIRANA *et al.* (2005) e SU *et al.* (2007), fatores como solvente, temperatura e tempo de extração, relação solvente:amostra, entre outros, influenciam significativamente na eficácia da extração e consequentemente, maior ou menor recuperação de compostos fenólicos.

Assim como para a torta de filtro, as extrações em refluxo a quente do bagaço sugerem eficácia maior na obtenção de substâncias fenólicas, que é melhorada em meio alcalino e partição subsequente em solvente adequado. No trabalho de ZHENG *et al.* (2017), o teor de fenólicos totais no o bagaço variou conforme a composição do solvente de extração, e o maior teor encontrado foi no extrato hidroalcoólico a 30%, alcançando de 170,68 ± 3,25 mg/g EAG. Os resultados desta

sessão corroboraram com a caracterização constitucional destas amostras, apresentadas nos capítulos nas seções 4.1.1 e 4.1.2.

### **4.3. Bioensaio de fitotoxicidade**

Todos os extratos e/ou frações da vinhaça, torta de filtro e bagaço, foram testados em ensaio de fitotoxicidade, onde foram avaliados os parâmetros de germinação, crescimento de raízes (radículas) e hipocótilos em *Lactuca sativa* (alface).

#### **4.3.1. Germinação**

A germinação foi avaliada por protusão radicular, 24 horas após a semeadura. Em todas as concentrações houve inibição na germinação, variando de 2,2% (TFMeOH 250 ppm) para a menor a 18,9% (BSapoD 500 ppm) para a maior taxa (Tabela 9).

Tabela 9. Efeitos dos extratos e partições sobre a germinação de *Lactuca sativa*.

Extratos e frações dos resíduos	% germinação a 500 ppm	% germinação a 250 ppm
VBruta	91,1%	87,8%
VHex	91,1%	91,1%
VDiCl	91,1%	95,6%
VAcOEt	92,2%	82,2%
VAq	94,4%	94,4%
EDV	93,3%	91,1%
ADV	82,2%	87,8%
TFAq	88,9%	88,9%
TFDiCl	88,9%	87,8%
TFEta	87,8%	90,0%
TFMeOH	93,3%	97,8%
TFSapoH	94,4%	90,0%
TFSapoD	92,2%	88,9%
BMeOH	88,9%	87,8%
BSapoD	81,1%	91,1%

[Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm), promoveram a germinação em 100%, 100% e 16,7%]

#### 4.3.2. Crescimento de raízes e hipocótilos

Os comprimentos de raízes e hipocótilos foram avaliados 120 horas (5 dias) após a semeadura. As raízes foram mais sensíveis aos extratos e/ou frações dos resíduos do que os hipocótilos (Gráficos 3, 4, 5 e 6).

Os efeitos inibitórios mais pronunciados foram das partições em diclorometano e em acetato de etila do resíduo vinhaça. Nas concentrações de 250 ppm e 500 ppm, a partição em diclorometano (VDiCl) inibiu o crescimento das raízes de *L. sativa* em 72,6% e 59,7%, respectivamente. Enquanto que nas mesmas concentrações, a partição em acetato de etila (VAcOEt) promoveu uma inibição de 62,13% e 30,67%, respectivamente (Gráfico 3 e 4).

De acordo com a tabela 9 e os gráficos 3, 4, 5 e 6, a inibição das raízes foi mais pronunciada do que os outros parâmetros avaliados. A maior sensibilidade das raízes se deve ao seu contato direto com as substâncias fitotóxicas (CHUNG *et al.* 2001). Elas são a primeira parte das plantas a absorverem tais substâncias (TURK e TAWAHA, 2002), as quais são extremamente ativas sobre os tecidos meristemáticos da raiz em crescimento (LADHARI *et al.* 2013). Devido a esta sensibilidade, as raízes são consideradas melhores indicadores de ação fitotóxica para compostos com potencial alelopático (LADHARI *et al.* 2013).

Apesar das partições em diclorometano e em acetato de etila da vinhaça apresentarem atividade fitotóxica mais significativa (discussão apresentada na seção posterior), os extratos, etanólico do decantado da vinhaça (EDV), metanólico da torta de filtro (TFMeOH) e metanólico do bagaço (BMeOH) destacam-se com maiores taxas de inibição se comparados ao seu respectivo grupo.

O extrato etanólico do decantado da vinhaça apresentou taxa de inibição para o crescimento de raízes de 50,2% e 27,51%, para a maior e a menor concentração, respectivamente. Tal extrato é constituído por ácido palmítico e ácidos fenólicos, como ácidos feruloilquínico e cafeoilquínico. O ácido palmítico é descrito como inibidor no crescimento de plantas (ALSAADAWI *et al.* 1983; TSUZUKI *et al.* 1987), enquanto o ácido cafeoilquínico é relatado como depreciador da germinação de plantas daninhas (SANTOS *et al.* 2011).

O extrato metanólico da torta de filtro exibiu taxa de inibição para o crescimento de raízes de 32,46% na concentração de 500 ppm, enquanto para a concentração de 250 ppm, não houve inibição significativa. Esse extrato apresenta-se como uma mistura de ácidos graxos e o componente majoritário é o ácido insaturado linoleico. É descrito na literatura que a presença de insaturações em ácidos graxos compostos melhora a resposta fitotóxica (CHIANG e HUANG *et al.* 2004). Relacionam esta toxicidade, a produtos de processos metabólicos ou foto-oxidativos (ALAMSJAH *et al.* 2008), também existem indícios de que ácidos graxos insaturados inibem a síntese de ATP (CALVO *et al.* 1999).

O extrato metanólico do bagaço exibiu taxa de inibição para o crescimento de raízes de 40,90% e 29,55% para a maior e menor concentração, respectivamente. As

análises de FT-ICR-MS e CG-EM revelaram um perfil químico formado por ácidos graxos, entretanto a quantificação de fenólicos totais mostrou que a amostra possui quantidade significativa de fenólicos. A presença destas classes de metabólitos secundários explica a considerável taxa de inibição, já que são descritas como substâncias fitotóxicas (INDERJIT e DUKE, 2003; MACÍAS *et al.* 2007). A toxicidade de ácidos fenólicos é relacionada à presença do anel aromático, que interfere processos que envolvam fluxo de carga eletrônica (MACÍAS *et al.* 2007).

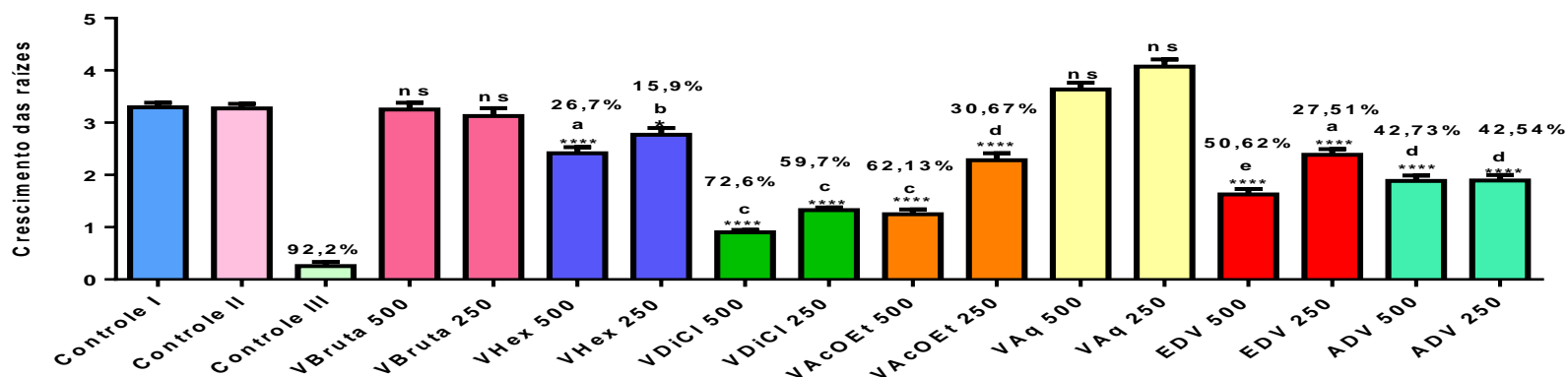


Gráfico 3. Efeito do extrato e/ou partições da vinhaça sobre o crescimento das radículas de *L. sativa*. [Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm). Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Significância determinada pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de inibição do crescimento são mostrados acima das letras. (ns = não-significativo comparados aos controles negativos).

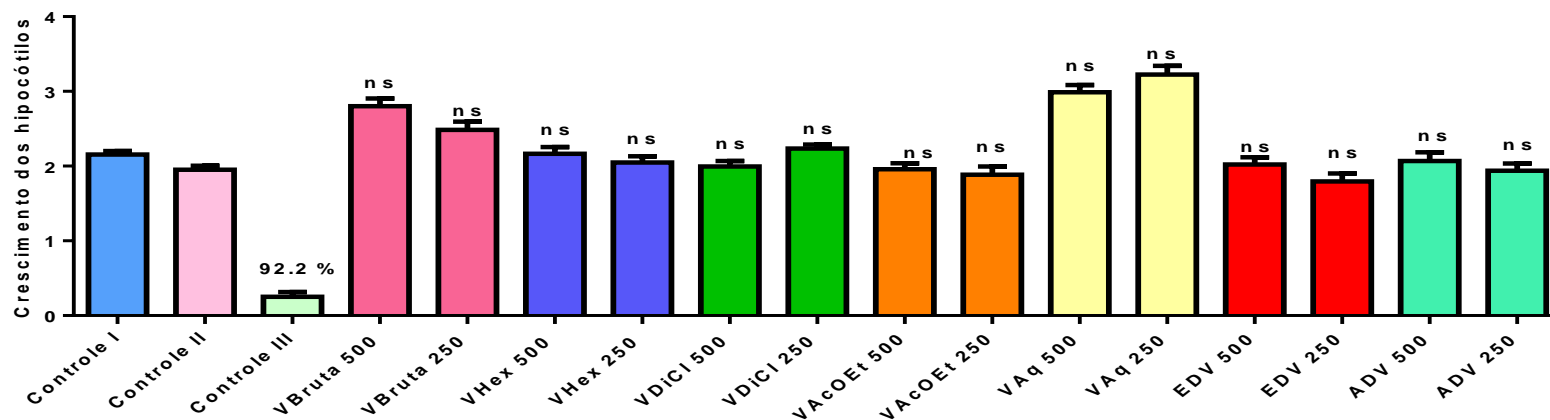


Gráfico 4. Efeito do extratos e/ou partições dos resíduos sobre o crescimento de hipocótilos de *L. sativa*. [Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm). Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Significância determinada pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (ns = não-significativo comparados aos controles negativos).

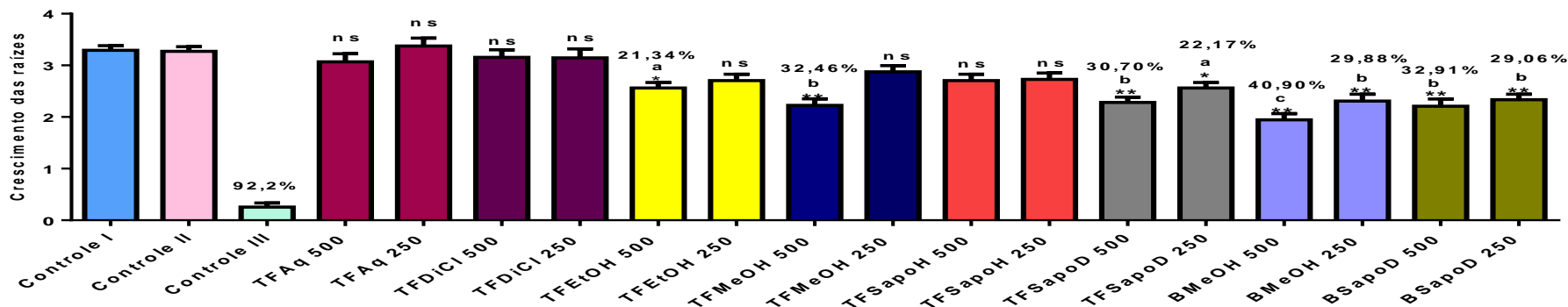


Gráfico 5. Efeito dos extrato da torta de filtro e bagaço sobre o crescimento das radículas de *L. sativa*. [Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm)]. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Significância determinada pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de inibição do crescimento são mostrados acima das letras. (ns = não-significativo comparados aos controles negativos).

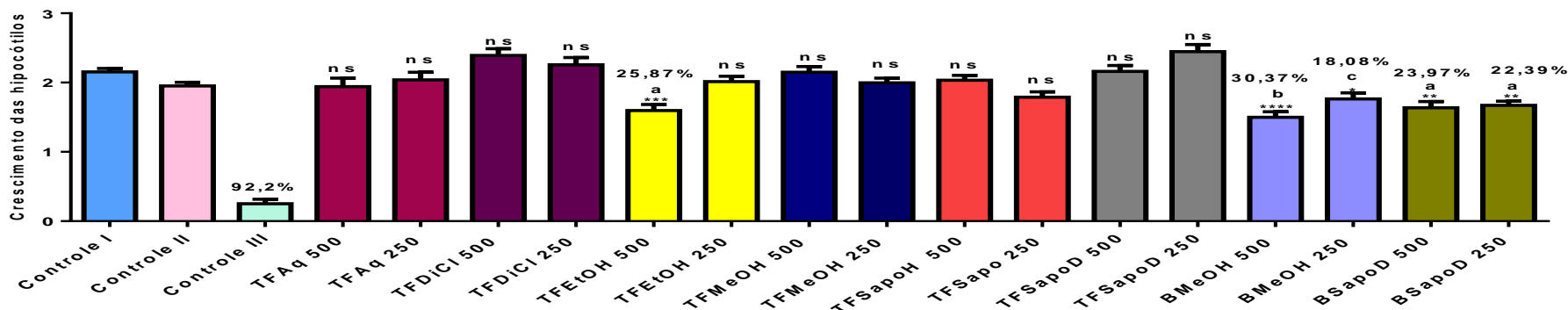


Gráfico 6. Efeito dos extrato da torta de filtro e bagaço sobre o crescimento de hipocótilos de *L. sativa*. [Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm)]. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Significância determinada pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de inibição do crescimento são mostrados acima das letras. (ns = não-significativo comparados aos controles negativos).

### 4.3.3. Determinação de $CI_{50}$ em *Lactuca sativa*

As frações que obtiveram inibição acima de 55% sobre o crescimento das sementes de *L. sativa* foram conduzidas a bioensaios em outras concentrações para determinação de  $CI_{50}$  (concentração inibitória média). As concentrações para a partições da vinhaça em diclorometano e em acetato de etila variaram de 500-125 ppm (Gráfico 7). Devido à maior sensibilidade do crescimento de raízes ao efeito fitotóxico, esse parâmetro foi considerado para o cálculo de  $CI_{50}$ . A partição em diclorometano apresentou valor de  $CI_{50}$  de 168,4 ppm, enquanto a partição em acetato de etila o valor determinado foi de 262,3 ppm.

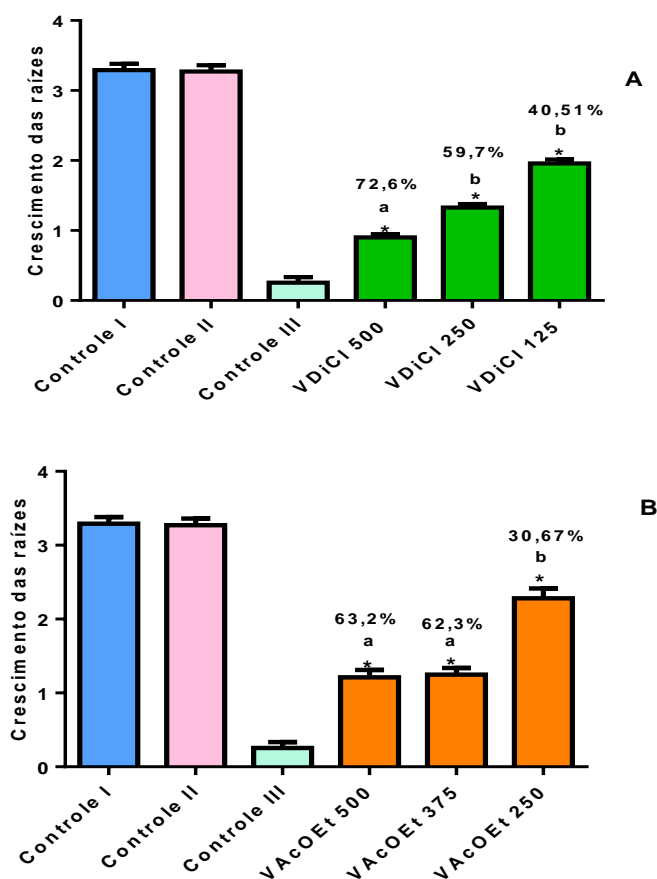


Gráfico 7. Efeito das partições diclorometano (A) e acetato de etila (B) sobre o crescimento das raízes de *L. sativa*. [Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm)]. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Significância determinada pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de inibição do crescimento são mostrados acima das letras.

A partição em diclorometano apresentou efeito inibitório mais acentuado, o resultado pode ser explicado pela presença mais equilibrada de ácidos graxos e de compostos fenólicos em sua composição (Tabela 7). Segundo EINHELLIG (1996), a ação conjunta de diferentes classes químicas de metabolitos secundários promove inibição e/ou supressão mais pronunciada, ou seja, a ação conjunta melhora a resposta fitotóxica. BARATELLI *et al.* (2012), propõe que as interações entre os ácidos graxos e compostos fenólicos presentes nas frações em diclorometano e acetato de etila das frutas de *T. catappa* são responsáveis pela promoção da ação inibitória do crescimento em raízes de alface. No trabalho de GOMES *et al.* (2016), a fração diclorometano do extrato bruto de folhas de *S. officinarum*, constituída de ácidos graxos e compostos fenólicos, foi mais ativa que aquelas onde só existiam fenólicos ou ácidos graxos.

Ácidos graxos e compostos fenólicos são comumente descritos em literatura como substâncias fitotóxicas, por causar modificações na membrana celular e interferir em processos que envolvam fluxo de carga, respectivamente. Acredita-se que ácidos graxos formem um canal iônico na membrana plasmática, acarretando em desorganização celular e conseqüentemente danos aos processos celulares fundamentais (ALAMSJAH *et al.* 2008). Já a toxicidade de fenólicos, é proporcionada pela presença do anel aromático que influencia na fotossíntese, no transporte e permeabilidade iônica da membrana celular e eliminação de radicais livres (MACÍAS *et al.* 2007).

Sugere-se que a presença dos ácidos graxos insaturados poli-hidroxilados 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico, 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico e 9,10,13-trihidroxi-11-octadecenoico, observadas na seção 4.1.1, estejam envolvidas na fitotoxicidade acentuada da partição em diclorometano da vinhaça, já que apresentam relevante intensidade de ionização se comparadas às outras amostras. Tais substâncias são classificadas como oxilipinas, metabólitos que derivam da oxidação de ácidos graxos insaturados (GRECHKIN, 1998); atuam no sistema imunológico das plantas, liberadas normalmente em situações que requeiram defesa vegetal. Além disso, estudos indicam que estejam envolvidos em processos de germinação, crescimento de raiz e maturação de frutos (BEISSON *et al.* 2007; KISHIMOTO *et al.* 2008).

A partição em acetato de etila apresentou um perfil químico constituído principalmente por compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides. Normalmente flavonoides não apresentam atividade fitotóxica pronunciada, mas quando envolvidos, promovem, geralmente, inibição no transporte eletrônico, prejudicando processos fisiológicos normais (EINHELLIG, 2005; MACIAS *et al.* 2007).

#### **4.3.4. Bioensaio e determinação de $CI_{50}$ com sementes de *Ipomoea purpurea***

As espécies do género *Ipomoea ssp* são plantas competidoras, que normalmente prejudicam o processo de colheita devido ao seu crescimento volúvel, atingindo diversas culturas, entre elas cana-de-açúcar e soja, sendo considerada espécie daninha (KISSMANN e GROTH, 1999; LORENZI, 2000; Planta daninha online, 2017).

Sementes de *Ipomoea purpurea* foram utilizadas para bioensaios de fitotoxicidade com as partições em diclorometano e acetato de etila do resíduo vinhaça. As concentrações testadas para a determinação de  $CI_{50}$  foram 500-168,4 ppm para a partição em diclorometano e 500-262,3 ppm para a partição em acetato de etila (Gráficos 8 e 9). Devido à maior sensibilidade das raízes aos compostos fitotóxicos, esse parâmetro foi avaliado.

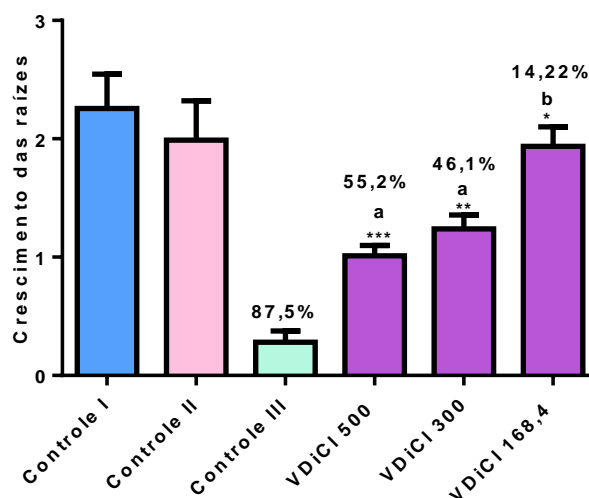


Gráfico 8. Efeito da partição em diclorometano da vinhaça sobre crescimento das raízes *I. purpurea*. [Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm)]. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Significância determinada pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de inibição do crescimento são mostrados acima das letras.

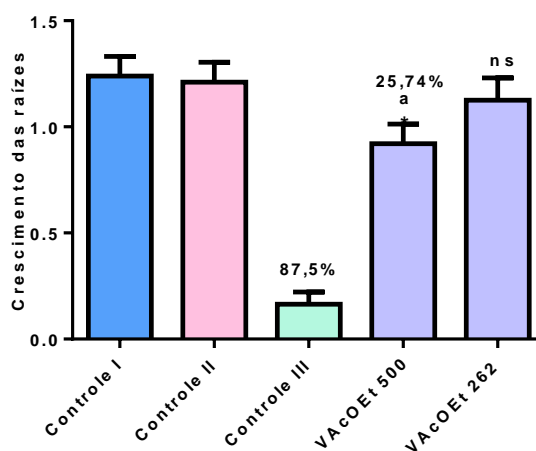


Gráfico 9. Efeito da partição em acetato de etila da vinhaça sobre *I. purpurea*. [Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm)]. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Significância determinada pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de inibição do crescimento são mostrados acima das letras. (ns = não-significativo comparados aos controles negativos).

Assim como nos os bioensaios realizados em *L. sativa*, a partição em diclorometano apresenta atividade fitotóxica mais pronunciada sobre a planta daninha. A inibição a 500 ppm foi de 55,2%. E o valor estabelecido para a  $CI_{50}$  foi de 344,0 ppm.

A partição em acetato de etila, exibiu a 500 ppm inibição de 25,74%. Não sendo possível determinar valor de  $CI_{50}$ , pois de acordo com os resultados obtidos nos bioensaios, a inibição de 50% encontra-se acima da concentração de 500 ppm.

O maior valor de  $CI_{50}$  estabelecido sobre o crescimento da planta daninha quando comparada à alface, demonstra a maior resistência da primeira espécie às substâncias fitotóxicas (Tabela 10). Segundo EINHELLING (1995) e DAYAN (2006), a maior resistência de algumas espécies está relacionada ao tamanho de sementes, já que normalmente plantas daninhas possuem sementes muito maiores que as da alface. O tamanho da semente favorece a uma menor absorção ou translocação dos compostos fitotóxicos e/ou maior rapidez na degradação metabólica dos mesmos (DAYAN, 2006).

**Tabela 10. Comparação de  $CI_{50}$  de *L. sativa* e *I. purpurea*.**

Partição	$CI_{50}$ (ppm) em crescimento de raízes de <i>L. sativa</i>	$CI_{50}$ (ppm) em crescimento de raízes de <i>I. purpurea</i>
VDiCl	168,4	344,0
VAcOEt	262,3	d*

**d\* - Não atingiu 50% na maior concentração testada.**

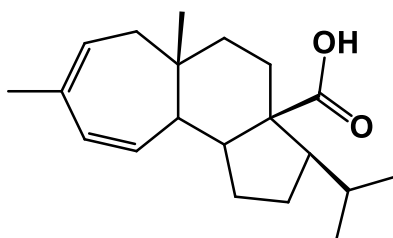
Como foi observado nos bioensaios, embora a partição em acetato de etila promova uma inibição considerável sobre o crescimento das sementes de alface, é necessário concentrações maiores para suprimir uma espécie mais resistente.

Tal resultado parece indicar que a distribuição mais uniforme entre ácidos graxos e fenólicos promova um efeito inibitório mais significativo do que aquelas onde só existam substâncias fenólicas ou ácidos graxos, ou em condições onde a presença de um em relação ao outro seja muito maior, principalmente frente a uma espécie de resistência elevada, como no caso da *Ipomoea purpurea*, o que corrobora com os estudos de EINHELLIG (1996) e INDERJIT e DUKE (2003), que relatam que o

fenômeno fitotóxico ocorre pela associação de diversos compostos de diferentes classes químicas, que atuam aditivamente ou sinergicamente.

O valor de  $CI_{50}$  da partição em diclorometano demonstra sua potencialidade quanto à atividade fitotóxica, já que trabalhos realizados com espécies da família Poaceae descrevem tal ação em concentrações mais elevadas, por exemplo, o extrato metanólico de *Echinochloa colona* (L.) Link, a uma concentração de 10 000 ppm, inibiu o crescimento em cerca de 72% de raízes de arroz (SITTHINOI *et al.* 2017), enquanto a uma concentração de 2 000 ppm o extrato hidroalcolólico de *Cymbopogon* sp. inibiu o crescimento de raízes de *Mimosa pudica* em 46% e *Senna obtusifolia* em 30% (DIAS e SOUZA FILHO, 2005).

No estudo de COLLOCA *et al.* (2010), o extrato etanólico de folhas de *Azorella biloba*, inibiu na concentração de 1 000 ppm aproximadamente em 40% o crescimento de raízes de *Ipomoea purpurea*, enquanto para a partição hexânica do extrato, a inibição foi de cerca de 38%. Tal resposta fitotóxica é atribuída a diterpeno ácido 11, 13-dien-mulin-20- oico (Figura 53).



**Figura 53. Estrutura ácido 11, 13-dien-mulin-20-ioco.**

*Ipomoea hederacea*, apresentou significativa tolerância frente a complexo fitotóxico sorgoleone extraído de sorgo, que possui como principal componente 2-hidroxi-5-metoxi-3-[(Z,Z)-8',11',14'-pentadecatrieno]-*p*-benzoquinona (Figura 54), o valor estabelecido para a  $CI_{50}$  foi superior a 200  $\mu$ M (NIMBAL *et al.* 1996).

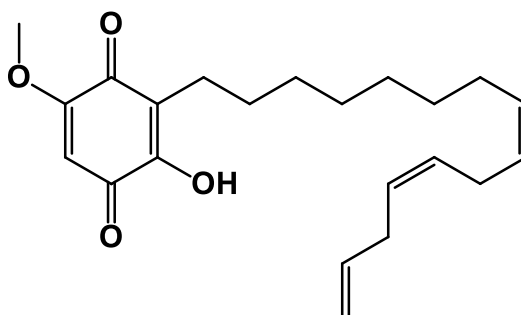


Figura 54. Estrutura 2-hidroxi-5-metoxi-3-[(Z,Z)-8',11',14'-pentadecatrieno]-*p*-benzoquinona

O gênero *Ipomoea* apresenta tolerância ao herbicida sintético glifosato (Figura 55), o mais comercializado no mundo. Acarretando em aplicação de doses cada vez maiores para seu controle, esta resistência é atribuída ao seu uso contínuo como único herbicida, o que promoveu a seleção de biótipos tolerantes ao agente ativo (HARTZLER e BOERBOOM, 2006; FERREIRA, *et al.* 2009).

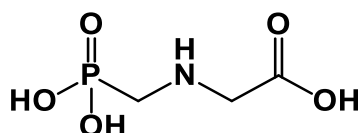


Figura 55. Estrutura glifosato.

No trabalho de Toledo *et al.* (2017), os herbicidas sintéticos associados, diuron + hexazinona + sulfometuron-metílico (Front<sup>®</sup>) [1386.9 + 391 + 33.35 g i.a. ha<sup>-1</sup>], amicarbazone (Dinamica<sup>®</sup>) + isoxaflutole (Dinamica<sup>®</sup>) [840 + 75 g i.a. ha<sup>-1</sup>], e tebuthiuron (Combine<sup>®</sup>) + isoxaflutole (Dinamica<sup>®</sup>) [900 + 75 g i.a. ha<sup>-1</sup>] obtiveram resultados mais satisfatórios no controle pré-emergencial de gloria da manhã (*Ipomoea hederifolia*, *Ipomoea quamoclit* e *Merremia aegyptia*) em plantações de cana-de-açúcar do que os herbicidas, amicarbazone (Dinamica<sup>®</sup>) [1225 g i.a. ha<sup>-1</sup>], sulfentrazone (Boral<sup>®</sup>) [900 g i.a. ha<sup>-1</sup>] imazapic (Plateau<sup>®</sup>) [154] aplicados isoladamente, corroborando com a elevada resistência da espécie.

#### 4.3.5. Bioensaio com misturas das frações mais ativas

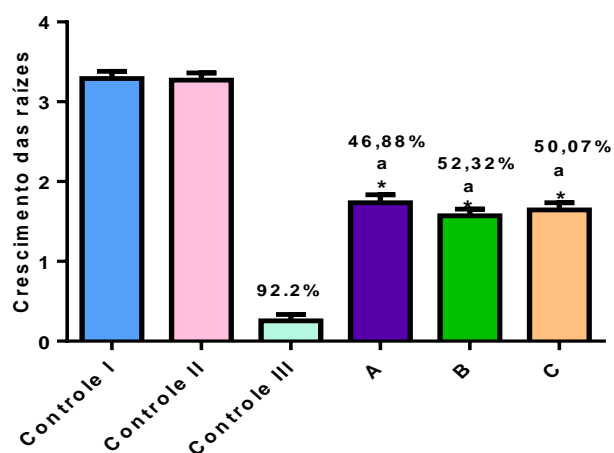
Misturas em diferentes proporções das partições mais ativas foram conduzidas a bioensaios na concentração 262 ppm (Gráfico 10), para verificar a interação dos componentes das amostras entre si.

A amostra A possui proporção igual das partições em diclorometano e acetato de etila e promoveu uma inibição de 46,88% do crescimento de raízes de *L. sativa*.

A amostra B tem proporção maior da partição em acetato de etila e inibiu em 52,32% o crescimento das raízes. O efeito da partição em acetato de etila é modestamente potencializado com a adição da partição em diclorometano, já que para a concentração de 262 ppm a inibição desta partição em acetato de etila sobre as raízes de *L. sativa* foi de 50%.

A amostra C possui proporção maior da partição em diclorometano e sua inibição sobre o desenvolvimento das raízes de *L. sativa* foi de 50,07%. O efeito observado nesta mistura é de antagonismo, pois a adição da partição em acetato de etila diminuiu significativamente a atividade fitotóxica da partição em diclorometano, já que na concentração de 250 ppm, tal partição foi capaz de inibir em 59,7% o crescimento de raízes de *L. sativa*. A redução de cerca de 10% na atividade fitotóxica também é observada quando se misturou padrões de ácido palmítico e ácido oleico (7:3) ao ácido cafeico, numa proporção 1:1 (GOMES *et al.* 2016), sugerindo que interações na natureza ocorram em concentrações específicas.

Os resultados desta seção sugerem que a interação e a concentração das substâncias fitotóxicas nas misturas seja fator determinante para o aumento ou a redução da atividade inibitória.



**Gráfico 10. Efeito das misturas das partições em diclorometano e acetato de etila da vinhaça sobre *L. sativa*. [Controle I = água destilada; Controle II= DMSO 0,1%; Controle III= Menadiona (143 ppm)]. Amostra A- 1:1 DiCl:AcOEt ; B – 2:8 DiCl:AcOEt ; C – 8:2 DiCl: AcOEt. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Significância determinada pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de inibição do crescimento são mostrados acima das letras.**

## 5. CONCLUSÃO

Na análise fitoquímica de ácidos graxos e compostos fenólicos dos resíduos agroindustriais por ESI (-) FT-ICR-MS/ DIC e por CG-EM, observou-se compostos em maioria já foram descritos em *Saccharum ssp.*, indicando que no processamento industrial não há perda destas substâncias. Três compostos inéditos em *Saccharum ssp* foram propostos através de análises por DIC, são esses os ácidos 9,12,13-trihidroxi-10,15-octadecadienoico e ácido 9,12,13-trihidroxi-10-octadecenoico/ácido 9,10,13 trihidroxi-11-octadecenoico. Nos bioensaios de fitotoxicidade em *Lactuca sativa*, as partições em diclorometano e em acetato de etila da vinhaça se mostraram mais ativas, alcançando valores de  $CI_{50}$  de 168,4 ppm para a VDiCl e 262,3 ppm para a VAcOEt. Já nos bioensaios com *Ipomoea purpurea*, a partição em diclorometano da vinhaça apresentou  $CI_{50}$  de 344 ppm, enquanto para a partição em acetato de etila da vinhaça não foi possível estabelecer um valor de  $CI_{50}$ , pois na concentração máxima definida, a inibição ficou abaixo de 50%. Na análise fitoquímica, a partição em diclorometano apresentou concentração relativa de ácidos graxos e compostos fenólicos próximas, sugerindo que a interação destes metabólitos promova maior taxa de inibição. A presença das oxilipinas sugere o envolvimento importante destas substâncias na fitotoxicidade mais acentuada da partição em diclorometano da vinhaça. Os bioensaios da partição em diclorometano da vinhaça, demonstraram a potencialidade fitotóxica desta amostra, já que em outros trabalhos, espécies da família Poaceae apresentam efeito fitotóxico bastante inferior e o gênero *Ipomoea* apresenta elevada resistência a herbicidas sintéticos. Nos bioensaios com as misturas das partições mais ativas, observou-se tanto interação antagonica, quanto aditiva. Sugerindo que a interação e a concentração de ácidos graxos e compostos fenólicos nas misturas seja fator determinante para o aumento ou a redução da atividade inibitória. Os resultados deste estudo demonstram o potencial fitotóxico de metabólitos secundários presentes nos resíduos advindos da indústria sucroalcooleira. Sugerindo que estes resíduos possam ser utilizados como matéria-prima para a elaboração de produtos de inovação, agregando valor a este material e minimizando as chances de danos ao meio ambiente pelo descarte incorreto.

## 6. REFERÊNCIAS

ALAMSJAH, M. A., HIRAO, S., ISHIBASHI, F., ODA, T., FUJITA, Y. Algicidal activity of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* and *U. pertusa* (Ulvaceae, Chlorophyta) on phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, **20**, 713–720, 2008.

ALSAADAWI, I. S., E. L. RICE; T. K. KARNS, 1983: Allelopathic effects of *Polygonum aviculare* L. III. Isolation, characterization, and biological activities of phytotoxins other than phenols. *J. Chem. Ecol.* **9**, 761—774

ALMEIDA JÚNIOR, A. B.; NASCIMENTO, C. W. A.; SOBRAL, M. F. Fertilidade do solo e absorção de nutrientes em cana-de-açúcar fertilizada com torta de filtro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.**15**, n.10, p.1004-1013, 2011.

AMB, M.K, AHLUWALIA A.S. Allelopathy: Potential Role to Achieve New Milestones in Rice Cultivation. *Rice Science*. **23**. pp 165–183, 2016

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.**73**, p.626-31, 2010.

ANGELINI, L. G; CARPANESE, G; CIONI, P. L; MORELLI, I; MACCHIA, M; FLAMINI, G. Essential Oils from Mediterranean Lamiaceae as Weed Germination Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6158–6164

APARICIO, J. D.; BENIMELI, C. S.; ALMEIDA, C. A.; POLTI, M. A.; COLIN, V. Integral use of sugarcane vinasse for biomass production of actinobacteria: Potential application in soil remediation. *Chemosphere*, Volume **181**, August 2017, p. 478–484.

APPLEBY, A.P; MULLER, F; CARPY. S (2000) Weed control. Pages 687–707 in Muller F, ed. *Agrochemicals*. New York: Wiley

ATTARD, T. M.; MCELROY, C. R.; REZENDE, C. A.; POLIKARPOV, I.; CLARK, J. H.; HUNT, A. J. Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. *Industrial Crops and Products*, **76**, 95–103, 2015.

BAHURUDEEN, A.; KANRAJ, D.; GOKUL DEV, V.; SANTHANAM M. Performance evaluation of sugarcane bagasse ash blended cement in concrete, *cem. Concr. Compos.* **59** (2015) 77–88.

BAIKOW, V. E. Filtration of Mud from Clarifiers Manufacture and Refining of Raw Cane Sugar. 2013, Pages 111–121.

BAJWA, A. A.; MAHAJAN, G.; CHAUHAN. B. S. Nonconventional weed management strategies for modern agriculture. *Weed Sci.*, **63** (2015), pp. 723–747.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*, v. **52**, p. 858-875, 2011.

BARATELLI, T. G. 2006. Estudo das propriedades alelopáticas vegetais: investigação de substâncias aleloquímicas em *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). (Dissertação – mestrado) Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BARATELLI, T. G.; GOMES, A. C. C.; WESSJOHANN, L. A.; KUSTER, R. M.; SIMAS, N. K. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **41**, 119-125, 2012.

BARKOSKY, R.R., BUTLER, J.L., EINHELLIG, F.A. 1999. Mechanisms of hydroquinone-induced growth reductions in leafy spurge. *J. Chem. Ecol.* **25** (7): 1611-1621.

BARKOSKY R. R; EINHELLIG F. A. Allelopathic interference of plant-water relationships by parahydroxybenzoic acid. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Vol. **44**, 2003.

BARZAGA, J. U.; PEREZ, J. A., SANTANA, J. A.: Producción de compost y resultados preliminares de su aplicación en áreas de la Empresa azucarera Dos Ríos. Jornada Científica por el 40 Aniversario del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. <http://www.santiago.cu/hosting/etica/Sede40/tec/t13.htm> (2004). Acesso em Maio 2017.

BASANTA, R., GARCIA DELGADO, M., CERVANTES, J.: Sostenibilidad del reciclaje

de residuos de la agroindustria azucarera. Una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. **5**, 293–305 (2007).

BAUMGARTEN, A.; SPIEGEL, H. *Phytotoxicity (Plant Tolerance)* Agency for Health and Food Safety, Vienna (2004).

BEISSON, F., LI, Y., BONAVENTURE, G., POLLARD, M., AND OHLROGGE, J.B. The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 351-368 (2007).

BERTIN C., YANG X., WESTON L.A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* **256**, 67–83. 2003.

BIN, Q.; PETERSON, D. G. Identification of bitter compounds in whole wheat bread crumb. *Food Chemistry* **203** (2016) 8–15.

BLUM, U. Designing laboratory plant debris- Soil bioassay: some reflections. IN: INDERJIT, DAKHINIK, K. M. N., FOY, C. L., eds. *Principles and practices in plant ecology*. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, p. 17-23.

BLUM, U. Fate of phenolic allelochemicals in soils – the role of soil and rhizosphere microorganisms, in *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*, ed. by Macías FA, Galindo JCG, Molinillo JMG and Cutler HG. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 57–76 (2004).

BRASIL. Ministério do Interior. Portaria nº 323, de 29 de novembro de 1978. [Proíbe o lançamento de vinhoto em coleções de água]. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 dez. 1978. Seção 1, p. 19456. Publicada também em: LEX: coletânea de legislação e jurisprudência: legislação federal e marginália, São Paulo, v. 42, p. 2749-50, out.- dez. 1978.*

BRASIL. Ministério do Interior. Portaria nº 158, de 03 de novembro de 1980. [Mantém proibição de lançamento direto ou indireto de vinhoto em qualquer coleção hídrica]. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 nov. 1980a. Seção 1, p. 22250. Publicada também em: LEX: coletânea de legislação e jurisprudência: legislação federal e marginália, São Paulo, v. 44, p. 1981-83, out.- dez. 1980.*

BRASIL, Resolução RDC nº 271, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento técnico para açúcares e produtos para adoçar- constante do anexo desta Resolução". órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_271\\_2005.pdf/b51df869-921a-412e-92d9-c1626871f383](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_271_2005.pdf/b51df869-921a-412e-92d9-c1626871f383).

BRASIL, Resolução nº 19, de 15 de abril de 2015. "Considerando percentual obrigatório de adição do Etanol Anidro Combustível à gasolina; e Considerando ser essencial a adoção de dispositivos regulatórios que evitem a comercialização de Etanol Anidro Combustível como Etanol Hidratado Combustível, com vistas a reprimir práticas fraudulentas no mercado". Diretoria geral da agência nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis - ANP. Disponível em: <http://spdistribuidora.com/administrador/docs/manual/20.pdf>

BRODIE, J. E; .KROON, F. J; WOLANSKI, E. C; LEWIS, S. E; BOHNET, I. C; BAINBRIDGE, Z. T; WATERHOUSE, J; DAVIS, A. M. Terrestrial pollutant runoff to the Great Barrier Reef: An update of issues, priorities and management responses. *Marine Pollution Bulletin* Volume **65**, Issues 4–9, 2012, Pages 81-100.

BRUNELLI, A. M. M. P.; PISANI Jr., R. Proposta de disposição de resíduo gerado a partir da queima do bagaço de cana em caldeiras como fonte de nutriente e corretivo do solo. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, **30.**, 2006, Punta del Leste. Anais...Punta del Leste: Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 2006. v. 1, p. 1-8.

BUSATO, J.G. Química do húmus e fertilidade do solo após adição de adubos orgânicos. 2008. 152 p. Tese (doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2008.

CADERBY, E.; BAUMBERGER, S.; HOAREAU, W.; FARGUES, C.; DECLoux, M.; MAILLARD, M. Sugar Cane Stillage: A Potential Source of Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, **61**, 11494–11501.

CALVO, A. M. et al. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. **65**, n. 8, p. 3668-3673, 1999

CAMARGO, C. A.; Conservação de Energia na Indústria do Açúcar e do Alcool: Manual de Recomendações. IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas; São Paulo, 1990; p 693.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, New York, c. 38, p. 1467-1475, 2011.

CARRILHO, E. N. V. M., LABUTO, G., KAMOGAWA, M.Y. Destination of vinasse, a residue from alcohol industry: Resource recovery and prevention of pollution. *Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention*. Pp 21–43, 2016.

CARVALHO, T. C.; SILVA, C. L. Redução da quantidade de vinhaça através da evaporação. *Fórum Ambiental da Alta Paulista*, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/134481>>.

CASAS, L; HERNÁNDEZ, Y; MANTELL, C; CASDELO, N; MARTINEZ DE LA OSSA, E. Filter Cake Oil-Wax as Raw Material for the Production of Biodiesel: Analysis of the Extraction Process and the Transesterification Reaction. *Journal of Chemistry Volume 2015 (2015)*, 9 p.

CERRI, C.C.; POLO, A.; ANDREAUX, F.; LOBO, M.C.; EDUARDO, B.P. Resíduos orgânicos da agroindústria canavieira: 1. Características físicas e químicas. *STAB, Açúcar, Alcool e Subprodutos, Piracicaba*, v.6, n.3, p.34-37, 1988

CETESB. Environmental Company of São Paulo State. Stillage - Criteria and Procedures for Agricultural Soil Application. 2nd Version. (2015) Available at: [www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/11/2014/12/DD-045-2015-C.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/11/2014/12/DD-045-2015-C.pdf)

CIB (Conselho de informações sobre biotecnologia) –Guia da cana-de-açúcar: Avanço científico. 2009. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3389774/mod\\_resource/content/0/guia\\_cana.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3389774/mod_resource/content/0/guia_cana.pdf). Acesso: Dez 2017.

CHAUHAN, B. S; GILL G. S (2014) Ecologically based weed management strategies. Pages 1–11 in Chauhan BS, Mahajan G, eds. *Recent Advances in Weed*

Management. New York: Springer

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology*, **4**, 62-89, 2011.

CHIANG, I.; HUANG, W.; WU, J. Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae) *J. Phycol.*, **40** (3) (2004), pp. 474-480

CHUNG, I.M., AHN, J.K., YUN, S.J. 2001. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. *Crop Protection*, **20**: 921-928. 2001.

COLE, R. B., ed.; *Electrospray Mass Spectrometry: fundamentals, instrumentation & applications*; John Wiley & Sons: New York, 1997.

COLLOCA, C. B.; ARIZA-ESPINAR, L.; SOSA, V. Determination of root growth inhibitory activity produced by diterpene isolated from *Azorella biloba*. *Organic Chemistry an Indian Journal*. **10**(10) 2014.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of further flavone C- and Oglycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLCUV-MS. *Phytochemical Analysis*, v. **17**, p. 337-343, 2006.

CONAB - Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da 40. Safra Brasileira. Cana de açúcar. V.2, nº 1. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_04\\_13\\_09\\_39\\_02\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_1o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_09_39_02_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf). Acesso: Junho/2017

CONIL, P.: Manejo de cachaza. Estudio de caso de un ingenio azucarero en Colombia. BIOTEC, Colombia, SA. Disponível em: [www.bio-tec.net](http://www.bio-tec.net) (2003). Acesso Maio 2017.

COSTA, H. B.; SOUZA, L. M.; SOPRANI, L. C.; OLIVEIRA, B. G.; OGAWA, E. M.; KORRES, A. M. N.; VENTURA, J. A.; ROMÃO, W. Monitoring the physical chemistry degradation of coconut water by ESI ( $\pm$ ) FT-ICR MS. *Food Chemistry*, **174**,139-146, 2015.

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

DASGUPTA, A.: Anaerobic digestion of solid wastes of sugar cane industry. PhD Disertation, University of Miami (1983).

DAYAN., F.E Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in *Sorghum bicolor*. *Planta*, **224** (2006), pp. 339-346.

DEL RÍO, J.C.; MARQUES, G.; LINO, A.G.; LIMA, C.F.; COLODETTE, J.L.; GUTIÉRREZ, A. Lipophilic phytochemicals from sugarcane bagasse and straw. *Ind. Crops Prod.*, **77** (2015), pp. 992–1000

DEMATTÊ, J.A.M.; GAMA, M.A.P.; COOPERA, M.;ARAÚJO, J.C.; NANNI, M.R. ; FIORIOA, P.R. Effect of fermentation residue on the spectral reflectance properties of soils. *Geoderma*, **120** (2004), pp. 187–2000

DEWICK P.M. 2009. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.

DIAS, A. P. C; SOUZA FILHO, A. P. S. Atividade potencialmente alelopática em extratos hidroalcoolicos de *Cymbopogon* sp (POACEAE). *Rev. ciênc. agrár.*, Belém, n. 44, p. 37-48, jul./dez. 2005

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica*. Editora UNESP. 2. ed. São Paulo, 2002. 592P.

DILLON, S. L.; SHAPTER, F. M.; ROBERT, H. J, CORDEIRO, G, IZQUIERDO, L, LEE, S. L (2007) Domestication to crop improvement: genetic resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogoneae). *Ann Bot* **5**:975–989.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., VIDAL A. N.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Antioxidant activity of phenolic compounds from sugarcane

(*Saccharum officinarum* L.) juice. *Plant Foods for Human Nutrition*, **61**, 187–192, 2006.

DUKE, S.O. Naturally occurring chemical compounds as herbicides. *Rev. Weed Sci.*, **2** (1986), pp. 15-44

DUKE S. O.; DAYAN F. E.; RIMANDO A. M. Natural products and herbicide discovery, in *Herbicides and their Mechanisms of Action*, ed. by Cobb AH and Kirkwood RC. Academic Press, Sheffield, pp. 105–133 (2000).

EINHELLIG, F. A. Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds In: Francisco A. Macías, Juan C.G. Galindo, José M.G. Molinillo, and Horace G. Cutler. (eds) *Allelopathy :chemistry and mode of action of allelochemicals*. CRC Press, pp 217-238, 2005.

EINHELLIG, F. A. 1995b. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In: Inderjit, Dakshini KMM, Einhellig FA (eds) *Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 96–116.

EINHELLIG, F. A. Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds. In: Macías, A. F. et al. *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals*. 1ª Edição. CRC Press LLC. 2004

EINHELLING, F.A., 1995a. Allelopathy: current status and future goals, in: Inderjit, K.M.M., Einhelling, F.A. (Eds.), *Allelopathy: Organisms, Processes and Applications*, ACS Symposium Series No. 582. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 1–7

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTÉS, J.O.; HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G.; DOMÍNGUEZ MALDONADO, J.A.; ALZATE-GAVIRIA, L.M. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnol. Biofuels*, **5** (2012), p. 82

FAP. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso: Maio de 2017

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia.

Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.12 (ed. esp.), p.175-204, 2000.

FERREIRA, E. A.; CONCENÇO, G.; VARGAS, L.; SILVA, A. A. Manejo de plantas daninhas tolerantes ou resistentes ao glyphosate no Brasil. Botucatu, FEPAF, 2009.

FRAVET, P.R.F; SOARES, R.A.B; LANA, R. M. Q; LANA, A. M.Q; KORNDÖRFER, G.H. Effect of filter cake doses and methol of application on yield and technologycal quality of sugar cane ratoon. Ciênc. agrotec. [online]. 2010, vol.34, n.3, pp.618-624.

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

GANSSER, D., SPITELLER, G. Plant constituents interfering with human sex hormone-binding globulin. Evaluation of a test method and its application to *Urtica dioica* root extracts. Z Naturforsch C. 1995 Jan-Feb; 50(1-2):98-104.

GAZZEIRO, D. L. P; VOLL, E.; ADEGAS, F. S. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas: situação atual e manejo. In: BOLETIM de pesquisa de soja 2011. Rondonópolis: Fundação MT, 2011. p. 416-421. (Fundação MT. Boletim de Pesquisa de Soja , 15).

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Efeito alelopatico de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinacao e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. Acta Botanica Brasilica, 18, 2004.

GEORGE, P. A. O., CABELLO, J. J E., GUTIERREZ, A. S., HENS, L., VANDECASTEELE. R. Residue from Sugarcane Juice Filtration (Filter Cake): Energy Use at the Sugar Factory . Waste Biomass Valor (2010) 1:407–413

GOMES, A. C. C. *Saccharum officinarum* (POACEAE) e suas variedades: estudo fitoquímico e avaliação do potencial antioxidante, antinociceptivo e alelopático. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2015 (Tese de doutorado).

GOMES, A.C.C., GOMES, A.K.C., MAGALHÃES, MAGALHÃES, P.D., BUSS, D. F., SIMAS, N. K., KUSTER, R. M. *In vitro* phytotoxic activity of *Saccharum officinarum* leaves on lettuce and weed *Calopogonium mucunoides*. *Allelopathy Journal* 39 (2): 177-190 (2016).

GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S.; BARRETO., L. C.; PIMENTA, L. P. S .; MATHEUS, M. T.; FIGUEREDO, C. C. Allelopathy: An overview from micro- to macroscopic organisms, from cells to environments, and the perspectives in a climate-changing world. *Biologia* **72/2**: 113—129, 2017 Section Botany.

GÓMEZ, J.; RODRÍGUEZ, O. Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v. **17**, p. 318-326, 2000

GRECHKIN, A. N (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progr Lipid Res* **37**, 317–352.

GRISI, P. U; GUALTIERI, S. C. J; RANAL, M. A ; SANTANA, D. G. Allelopathic influence of aqueous extract of *sapindus saponaria* l. root on barnyardgrass and morningglory. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. **29**, n. 3, p. 760-766, May/June 2013.

GUPTA, P. K. *Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)*. 2017, Chapter 37 – Herbicides and Fungicides. Pages 657–679

HAHN-HÄGERDAL, B; GALBE, M; GORWA-GRAUSLUND, M. F, LIDÉN, G; ZACCHI, G. Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 2006 Dec;**24**(12):549-56. Epub 2006 Oct 16.

HARTZLER, B.; BOERBOOM, C. Understanding glyphosate to increase performance. Iowa: Academic Press, 2006. 8 p

HITCHCOCK, A. S. Types species of the first 100 genera of Linnaeus "Species Plantarum". *Botanical Society of America*, Saint Louis, v. **1**, p. 510-517, jan 1923.

HONG, S. S.; OH, J. S Inhibitors of Antigen-induced Degranulation of RBL-2H3 Cells Isolated from Wheat Bran. *J Korean Soc Appl Biol Chem* (2012) **55**, 69–74.

HONIG, P. *Principles of sugar technology*. New York: Elsevier Publishing Company, v.1, 1953.

HOSSAIN, M.; RAI, D.; BRUNTON, N.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Characterization of Phenolics Composition in *Lamiaceae* Spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*2010, **58** (19), pp 10576–10581.

HUGGOT, E. Manual da Engenharia Açúcareira. São Paulo; Mestre Jou, v.1, 1977.

HUSSAIN, I; SINGH, N. B; SINGH, A. SINGH, H. Allelopathic potential of sesame plant leachate against *Cyperus rotundus* L. Annals of Agrarian Science Volume **15**, Issue 1, March 2017, Pages 141–147

INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. Botanical Review, v.**62**, p.186-202, 1996.

INDERJIT, A. U.; DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. Planta 217,529–539, 2003.

INDERJIT, A.U; MALLI, J. Effects of phenolic compounds on selected soil properties. Forest Ecol Manage, 92 (1997), pp. 11-18  
Forest Ecol Manage, **92** (1997), pp. 11-18.

INDERJIT., STREIBIG, J. C., OLOFSDOTTER, M. Joint action of phenolic acid mixtures and its significance in allelopathy research. Physiologia Plantarum, **114**, 422–428, 2002.

INNOCENTE, A. F. Cogeração a partir da biomassa residual de cana-de-açúcar: estudo de caso. 2011. 111 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/90495>>.

IPEA. INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA E APLICADA. Biocombustível no Brasil: etanol e biodiesel. Brasília, 2010. 62 p. (Séries Eixos do Desenvolvimento; Comunicado Técnico, 53).

KATO, T.; YAMAGUCHI, Y.; UYEHARA, T.; YOKOYAMA, T.; NAMAI, T; YAMANAKA, S. Defense mechanism of the rice plant against rice blast disease. Naturwissenschaften, **70**, 200 (1983).

KERWIN, J. L.; Wiens, A. M.; Ericsson, L. H.; Identification of Fatty Acids by Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, VOL. **31**, 184-192 (1996).

KIM, J. S.; YEAN, M. H.; SEO, H. K.; LEE, J. H.; KANG, S. S (2009) Phytochemical studies on *Lonicera caulis* (2) -aliphatic and phenolic compounds. *Korean J Pharmacogn* **40**, 326–333.

KISHIMOTO, K., MATSUI, K., OZAWA, R., AND TAKABAYASHI, J. Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **69**, 2127-2132.2007.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. São Paulo: BASF, 1999. Tomo II, 978p.

KLESSIG, D. F; MALAMY J. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* 26:1439–1458 (1994).

KOHLHEPP, Gerd. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. *Estud. av.* vol. **24** n<sup>o</sup>, 68 São Paulo 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000100017> >

KOBLITZ, M. G. B. Estudo de método para remoção de polissacarídeos que precipitam em cachaça. 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KRAEHMER, H. Innovation: changing trends in herbicide Discovery. *Outlooks Pest Manag.*, **23** (2012), pp. 115–118

KUMAR ,R ; VERMA, D; SINGH, B. L; KUMAR. U. Composting of sugar-cane waste by-products through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 17, pp. 6707–6711, 2010.

KURTIS, K. E. Innovations in cement-based materials: addressing sustainability in structural and infrastructure applications. *MRS Bull.*, **40** (2015), pp. 1102–1109

LAIME, E.M.O., FERNANDES, P.D., OLIVEIRA, D.C.S., FREIRE, E.A., 2011. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. *R. Trop. Ci. Agr. Biol.* **5**, 16–29.

LANDELL, M.G.A.; BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A.(Ed.). *Cana-de-açúcar*. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 101-155.

LADHARI, A.; OMEZZINE, F.; DELLAGRECA, M.; ZARRELLI, A.; ZUPPOLINI, S.; HAOUALA, R. Phytotoxic activity of *Cleome arabica* L. and its principal discovered active compounds. *South African Journal of Botany*, **88** (2013), pp. 341–351.

LEWELLYN, R.S; RONNING, D; OUZMAN, J; WALKER, S;MAYFIELD, A; CLARK, M. Impact of Weeds on Australian Grain Production: the Cost of Weeds to Australian Grain Growers and the Adoption of Weed Management and Tillage Practices. Australia (2016).

LI, Z. H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C. D.; JIANG, D. A. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, **15**, 8933–8952, 2010.

LIMA, L. S. M. S; ALMEIDA, R.; QUINTAES, B. R.; BILA, D. M.; CAMPOS, J. C. Análise de metodologias de quantificação de substâncias húmicas em lixiviados de aterros de resíduos sólidos. *Revista Ambiente & Água. Rev. Ambient. Água* vol.**12** nº.1 Taubaté Jan./Feb. 2017.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, v. **93**, n. 1, p. 43-56, 2005.

LLEWELLYN, R. S; RONNING, D; OUZMAN, J; WALKER, S; MAYFIELD, A; CLARKE, M (2016). Impact of Weeds on Australian Grain Production: the cost of weeds to Australian grain growers and the adoption of weed management and tillage practices. Report for GRDC. CSIRO, Australia.

LORENZI, H. J. Plantas daninhas do Brasil. 3.ed. São Paulo: Inst. Plantarum, 2000. p. 127-137.

MACIAS, F.A., GALLINDO, J.C.G., MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunicators: Application of allelopathic studies. In: *Years of Natural Products Research Past, Present and Future*, Ed Teus J.C. Luijendijk, Phytoconsult, 2000.

MACÍAS, F. A., MARÍN, D., OLIVEROS-BASTIDAS, A., MOLINILLO, J. G. Optimization of Benzoxazinones as Natural Herbicide Models by Lipophilicity Enhancement. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, 9357-9365, 2006.

MACÍAS, F. A., MOLINILLO, J. M., VARELA, R. M., GALINDO, J. C. Allelopathy – a natural alternative for weed control. *Pest Manag Sci* **63**:327–348 (2007).

MAGNUSSON, M; HEIMANN, K; RIDD, M; NEGRI, A. P. Chronic herbicide exposures affect the sensitivity and community structure of tropical benthic microalgae. *Mar Pollut Bull.* 2012; **65** (4-9):363-72

MAKUL, N; SUA-IAM, G. Characteristics and utilization of sugarcane filter cake waste in the production of lightweight foamed concrete. *Journal of Cleaner Production.* Volume 126, **10** July 2016, Pages 118-133.

MARTIN-ARJOL, I., BASSAS-GALIA, M., BERMUDOC, E., GARCIA, F., MANRESA, A. Identification of oxylipins with antifungal activity by LC–MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2 . *Chemistry and Physics of Lipids* **163** (2010) 341–346.

MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges . *Ecol Appl*, 18 (2008 LUTZ, H.; ESUOSO, K.; KUTUBUDDIN, M.; BAYER, E. Low temperature conversion of Sugar-Cane by-products. *Biomass and Bioenergy*, v.**15**, n.2, p.155-162, 1998.), pp. 885–898.

MELLO JR., C. A., COSTA, O. R. L.; MACHADO, P. F.; D'ARCE R. D. E MATTOS, W. R. S., Efeito do tratamento a pressão de vapor no bagaço de cana de açúcar sobre a sua degradação in vitro e digestibilidade in vivo, *Livestock Research for Rural Development* vol. **1**, nº 1, novembro 1989. 39 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de concentração e Tecnologia de produção Agrícola) – Instituto Agronomico –IAC, Campinas, 2007.).

MEUNCHANG, S.; PANICHSAKPATANA, S.; WEAVER, R. W. Co-composting of filter cake and bagasse; by-products from a sugar mill. *Bioresour Technol.* 2005 Mar;**96**(4):437-42.

MILLER, D. A. Allelopathy in forage crop system. *Agron J*, **88**-854-859, 1996.

MOLISCH H. (1937). Der Einfluss Einer Pflanze Auf Die Andere-allelopathie . Jena: Fischer.

MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Comportamento sortido dos herbicidas S-Triazinas em solo e ácidos húmicos. *Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*. Curitiba, v.8, p. 157-170, jan/dez 1988.

MORAES, P. A. Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis* e distribuição espacial dos metabólitos secundários das folhas de espécies de *Psychotria* e *Palicourea* por DESI-MS direto e indireto. Universidade Federal de Goias. Tese de doutorado. 2017.

MORAIS, S. L.; REZENDE, M. O. O. Comportamento sortido dos herbicidas S-Triazinas em solo e ácidos húmicos. *Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*. Curitiba, v.8, p. 157-170, jan/dez 1988.

MORELAND, D. E.; NOVITZKY, W.P. Effects of phenolic acids, coumarins, and flavonoids on isolates chloroplasts and mitochondria. In: WALLER, G. R. (Ed.). *Allelochemicals: role in agriculture and forestry*. Washington: American Chemical Society, 1987. p. 247-261.

NIMBAL, C.; PEDERSEN, J. F.; YERKES, C. N.; WESTON, L. A.; WELLER, S. C. Phytotoxicity and Distribution of Sorgoleone in Grain Sorghum Germplasm. *J. Agric. Food Chem.* 1996, **44** (5), pp 1343–1347.

NUNES JUNIOR, D. Torta de Filtro: de resíduo a produto nobre. *Idea News*, ano 8, n.92. junho, p.2-30, 2008.

OUESLATI, M. H; BEN JANNET, H; MIGHRI, Z; CHRILAA, J; ABREU, P. M. Phytochemical constituents from *Salsola tetrandra*. *J Nat Prod.* 2006 Sep; **69** (9):1366-9.

PANAGOPOULOS, Y; MAKROPOULOS, C; MIMIKOU, M. Decision support for diffuse pollution management. *J. Environ. Modell. Softw.*, **30** (2012), pp. 57–70

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Bioresour. Technol.*, **98** (2007), pp. 2321–2334.

PASSOS, J.L.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; BARRETO, R. W.; KING-

DIAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Effects of *Corynespora cassiicola* on *Lantana camara*. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. **28**, n. 2, p. 229-237, 2010.

PENATTI, C.P.; BONI, P.S. Efeito da torta de filtro na cana planta e cana soca. Centro de Tecnologia Copessucar. Relatório Técnico, Piracicaba. 1989. 7 p.

PERES. S., Gás do bagaço de cana: um combustível substituto do gás natural. In XV SNTPEE Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica, Foz do Iguaçu – Paraná 1999.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; HONT, A. d'. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. Molecular Genetics and Genomics, Berlin, v. **284**, n. 1. P.65-67, 2010.

PIPO, A., GARZONE, V.P., CORNACCIA, G.: Agro-industry sugarcane residues disposal: the trends of their conversion into energy carriers in Cuba. Waste Manage. **27**, 869–885 (2007)

PITARELO, A.P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PNRS - Plano Nacional de Resíduos Sólidos. Decreto nº 7.404/10, que regulamenta a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Brasília: Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, 2011. 44p.

PRASAD, M. The effect of filter press mud on the availability of macro and micronutrients. In: CONGRESS OF THE ISSCT, 15, Durban, 1974. Proceedings... v.2, p.568-575, 1974.

PRASAD, M. Response of sugarcane to filter press mud and N, P and K fertilizers. II. Effects of plant composition and soil chemical properties. Agronomy Journal, v. **68**, p.543-547, 1976.

PUTNAM, J. D; BARNES, J. P. Exploitation of allelopathy for weed control in annual and perennial cropping systems. Journal of Chemical Ecology, Vol. **9**, No. 8, 1983

QIAN, H.; XU, X.; CHEN, W.; JIANG, H.; JIN, Y.; LIU, W.; FU, Z. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, **75** (2009), pp. 368-375

RABELO, S. C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, Philadelphia, v. 102, p. 7887-7895, 2011.

RAMALHO, J. F.; AMARAL Sobrinho, N. M. Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. *Revista Floresta Ambiente*, V.8 Nº 1 jan./dez. de 2001.

RICE, E.L. Allelopathy. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984.

RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. Exploration of allelochemicals in improving crop productivity. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. (Eds.). *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London: Chapman & Hall, 1992, p.443-472

SAMPIETRO, D. A., VATTUONE, M. A. Nature of the interference mechanism of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) straw. *Plant and Soil* (2006) **280**:157–169. DOI 10.1007/s11104-005-2856-5

SAMPIETRO, D.A.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Plant growth inhibitors isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum*) straw. *Journal of Plant Physiology* **163** (2006a) 837—846

SAMPIETRO, D.A., VATTUONE, M. A. 2006b. Sugarcane straw and its phytochemicals as growth regulators of weed and crop plants. *Plant Growth Regul.* **48**:21–27.

SANTOS, S.; MORAES, M.L.L; REZENDE, M.O.O.; SOUZA FILHO, A.P.S. Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar. *Eclética Química. Eclét. Quím.* vol.**36** no.2 São Paulo 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702011000200003>.

SECEX. Secretaria do comércio exterior. SECEX (Base de Dados AliceWeb) -

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior - Dados atualizados em 01/10/2017. Acesso em dezembro 2017.

SEPAT, S; THIERFELDER, C; SHARMA, A. R; KUMAR, IQUEBAL, M. A. VERMA, A. Effects of weed control strategy on weed dynamics, soybean productivity and profitability under conservation agriculture in India. *Field Crops Research*. Volume **21**. 15 August 2017, Pages 61-70.

SHIN, J. S; HONG, Y; LEE. H.H; RYU, B; CHO, Y.W; KIM, N. J; JANG, D. S; LEE, K. T. Fulgidic Acid Isolated from the Rhizomes of *Cyperus rotundus* Suppresses LPS-Induced iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 Expression by AP-1 Inactivation in RAW264.7 Macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **38**, 1081–1086 (2015) Vol. 38, No. 7.

SIEGLER, D, S. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 115 (1998).

SILVA, A. P. D. Caracterização de metabolitos não voláteis da cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara/SP, Brasil (2012).

SILVA, D. A. L.; DELAI, I.; MONTES, M. L. D.; OMETTO, A. R. Life cycle assessment of the sugarcane bagasse electricity generation in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Amsterdam, v. **32**, p. 532-547, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.12.056>.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELE, N. P.; BORGES, L. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.**11**, n.1, p.108–114, 2007.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização de bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de materiais e Processos*, Campina Grande, v.**2**, p.27-32, 2007.

SINGH, P., SUMAN, A., SHRIVASTAVA, K. 2003. Isolation and identification of allelochemicals from sugarcane leaves. *Allelopathy J.* **12**(1):71–80.

SINGH, A.; LAL, U. R.; MUKHTAR, H. M.; SINGH, P. S.; SHAH, G.; DHAWAN, R. K.

Phytochemical profile of sugarcane and its potential health aspects. *Pharmacognosy Review* ,9 (17): 45–54, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. 1999. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent methods. *Enzymol* **299**, 152-178.

SINITOX-Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico, registrados em 2014. Disponível em <https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//2014-Brasil-tabela10.pdf>. Acesso em: Agosto/2017.

SITTHINOI, P.; LERTMONGKOL, S.; CHANPRASERT, W.; VAJRODAYA, S. Allelopathic effects of jungle rice (*Echinochloa colona*(L.) Link) extract on seed germination and seedling growth of rice. *Agriculture and Natural Resources*. Volume **51**, Issue 2, April 2017, Pages 74-78.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. D.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. D.; MORAES, L. M. P.; ARAUJO, J. D. Bioetanol de lignoceluloses: status e perspectivas no Brasil. *Bioresour. Technol.*, **101** (2010), pp. 4820-4825.

SOLER DA SILVA, M. A.; KLIEMANN, H. J. ; BORGES DE-CAMPOS, A.; MADARI, B.E. ; BORGE, J.D.; GONÇALVES, J.M.. Effects of vinasse irrigation on effluent ionic concentration in Brazilian Oxisols. *Afr. J. Agric. Res.*, **8** (45) (2013), pp. 5664–5677.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR.; G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, **30** (2), 351- 355, 2007.

SU, L. et al. Total phenolic contents, chelating capacities, and radicalscavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food*

Chemistry, v. **100**, n. 3, p. 990-997, 2007.

SUZUKI, M.; KHAN, M. S. L.; SUENAGA, A. I. K.; KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic potential and an allelopathic substance in mango leaves. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* Vol. **67**, Iss. 1, 2017

SWANTON, C. J; NKOA, R; BLACKSHAW, R. E. Experimental methods for crop-weed competition studies. *Weed Sci.*, **63** (sp1) (2015), pp. 2–11.

SZMRECSÁNYI, T; MOREIRA, E. P. O desenvolvimento da agroindústria canavieira do Brasil desde a Segunda Guerra Mundial. *Estud. av.* vol.**5** nº.11 São Paulo Jan./Apr. 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2009. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 848 p.

TEIXEIRA, S.R., MAGALHÃES, R.S., ARENALES, A., SOUZA, A.E., ROMERO, M., RINCÓN, J.M., 2014. Valorization of sugarcane bagasse ash: producing glass-ceramic materials. *J. Environ. Manage.* **134**, 15–19.

TOLEDO, R. E. B.; FILHO, R. V.; NEGRISOLI, E.; CORREA, M. R. Management of morning glory (*Ipomea hederifolia*, *Ipomea nil*, and *Merremia aegyptia*) with herbicides in raw sugarcane during dry seasons. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.**16**, n.2, p.84-90, abr./jun. 2017.

TORRES RODRÍGUEZ, M. T. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, Ciudad de la Habana*, v. **41**, n. 2/3, dic. 2003. Disponível em:<[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S15613003200300020009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15613003200300020009)>. Acesso em: 10 dezembro. 2017.

TSO, T. C. Plant-growth inhibition by some fatty acids and their analogues. *Nature*, v. **202**, p. 511-512, 1964.

TUR, C. M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*. *Revista Biotemas*, 2 (**23**), 13-22, 2010.

TURK, M. A.; TAWAHA, A. M. Inhibitory effects of aqueous extracts of barley on

germination and growth of lentil. *Pakistan Journal of Agronomy*, 1 (2002), pp. 28–30

TSUZUKI, E., Y. YAMAMOTO, AND T. SHIMIZU, 1987: Fatty acids in buckwheat are growth inhibitors. *Ann. Bot.* **60**, 69—70

UMEDA, P.U; RANAL, M. A; GUALTIERI, S. C. J; SANTANA, D. G. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. *Agronomy Maringá*, v. **34**, n. 1, p. 1-9, Jan.-Mar., 2012.

VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A (Ed.). *Cana-de-açúcar*. Campinas. Instituto Agronômico, 2010. p. 101-156.

VIATOR, R. P., JOHNSON, R. M., GRIMM, C. C., RICHARD, E.P. J., Allelopathic, Autotoxic, and Hormetic Effects of Postharvest Sugarcane Residue. *Agron. J.* **98**:1526–1531 (2006).

VIDAL, W. M.; VIDAL, M. R.R. *Botânica – organografia; quadros sinóticos ilustrados de fanerógamas*. Viçosa: UFV Ed.; 2003. 124 p.

VIEIRA, D.B. *Fertirrigação sistemática da cana-de-acúcar com vinhaça. Álcool e Açúcar*, n. 28, 1986.

VILA, F.C .; COLOMBO, R.; LIRA, T. O.; YARIWAKE, J. H. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. *J. Braz. Chem. Soc.* vol.**19** no.5 São Paulo 2008.

VOLL, E. et al. *Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja*. *Planta Daninha*, v. **20**, n. 1, p. 17-24, 2002.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, **58**, 1631-1646, 2002.

YADAV, R.L., SOLOMON, S. Potential of developing sugarcane by-product based industries in India. *Sugar Tech.* **8** (2006) 104–111.

WALLER, G. R.; FEUG, M. C.; FUJII, Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms, and soil secondary metabolites. In: INDERJIT-DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. (Eds.). *Principles and practices in plant ecology*.

Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 75-98.

WALTERS, D. R.; COWLEY, T.; WEBER, H. 2006. Rapid accumulation of trihydroxy oxylipins and resistance to the bean rust pathogen *Uromyces fabae* following wounding in *Vicia faba*. *Annals of Botany* **97**, 779–784.

WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 472–479, 2004.

WILLIS, R. J (1994) Terminology and trends in allelopathy. *Allelopathy J* 1:6–28

WILLIS, R. J. *The History of Allelopathy*. Springer Science & Business Media, 2007.

WU, H.; PRTLEY, J.; LEERLE, D.; HAIG, T.; AN, M. 2001. Screening Methods for the Evaluation of Crop Allelopathic Potencial. *The Botanical Review*, v. **67**, n. 3.

WU, J.; CHIANG, Y.; HUANG, W.; JANE, W. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic Toxicology*. Volume **80**, Issue 4, 30 December 2006, Pages 338-345.

XUAN, T. D; ANH, L. H, KHANG, D. T.; TUYEN, P. T.; MINH, T. N.; KHANH, T. D.; TRUNG, K. H. Weed Allelochemicals and Possibility for Pest Management. *International Letters of Natural. Sciences Submitted*: Vol. **56**, pp 25-39.

ZHENG, R.; SU, S.; ZHOU, H.; YE, J.; ZHAO, Z.; YOU, L.; FU, X. Antioxidant/antihyperglycemic activity of phenolics from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse and identification by UHPLC-HR-TOFMS. *Industrial Crops and Products*. Volume **101**, July 2017, Pages 104-114.

## ANEXOS

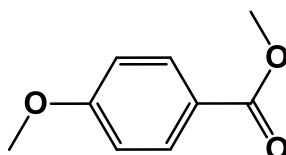
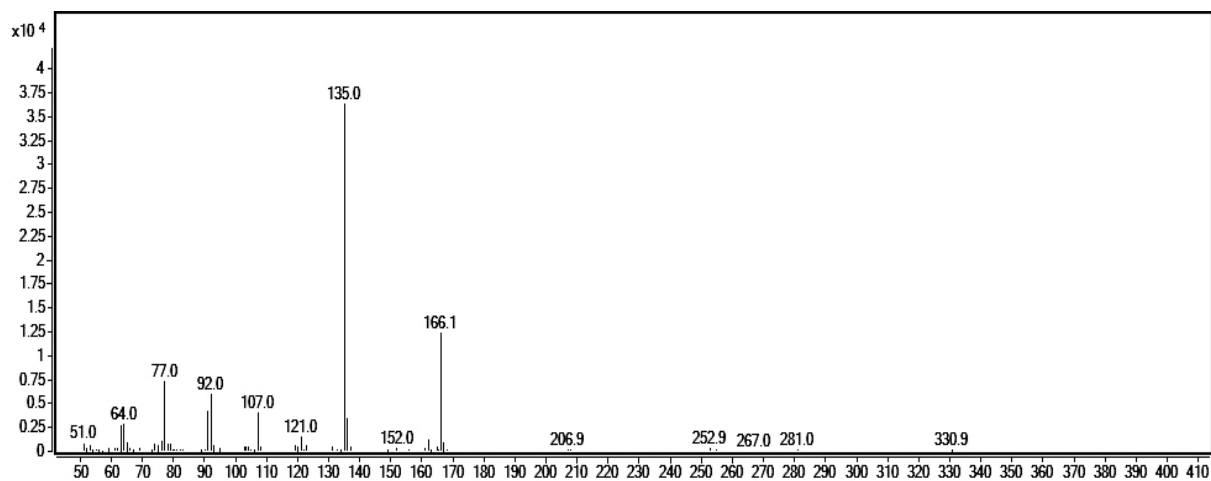


Figura A. A1. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido p-metoxi benzoico de acordo com a biblioteca NIST 11.

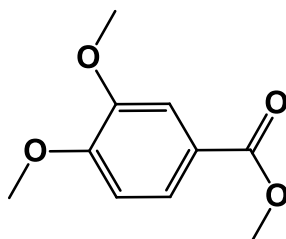
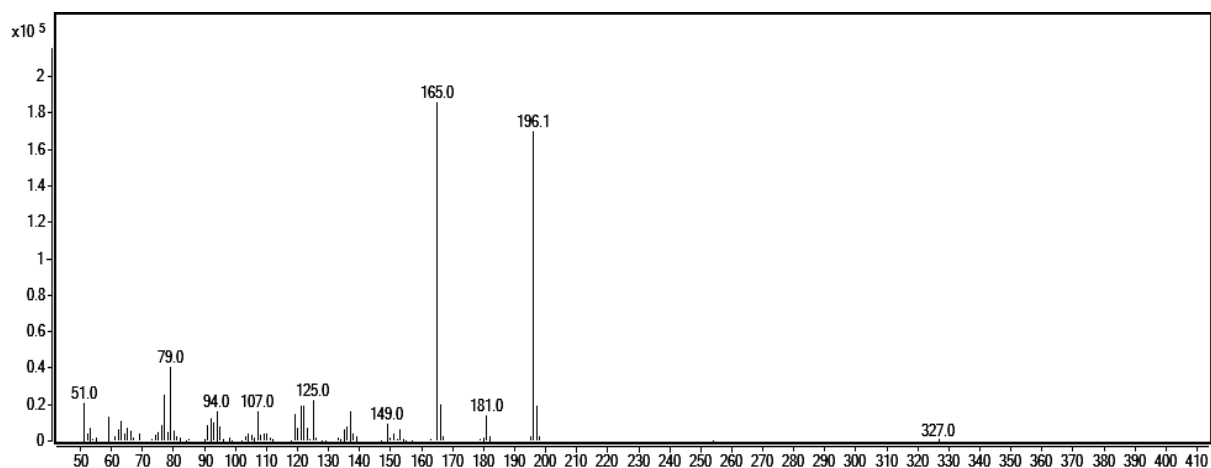


Figura A. A2. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido 3,4-metoxibenzoico de acordo com a biblioteca NIST 11.

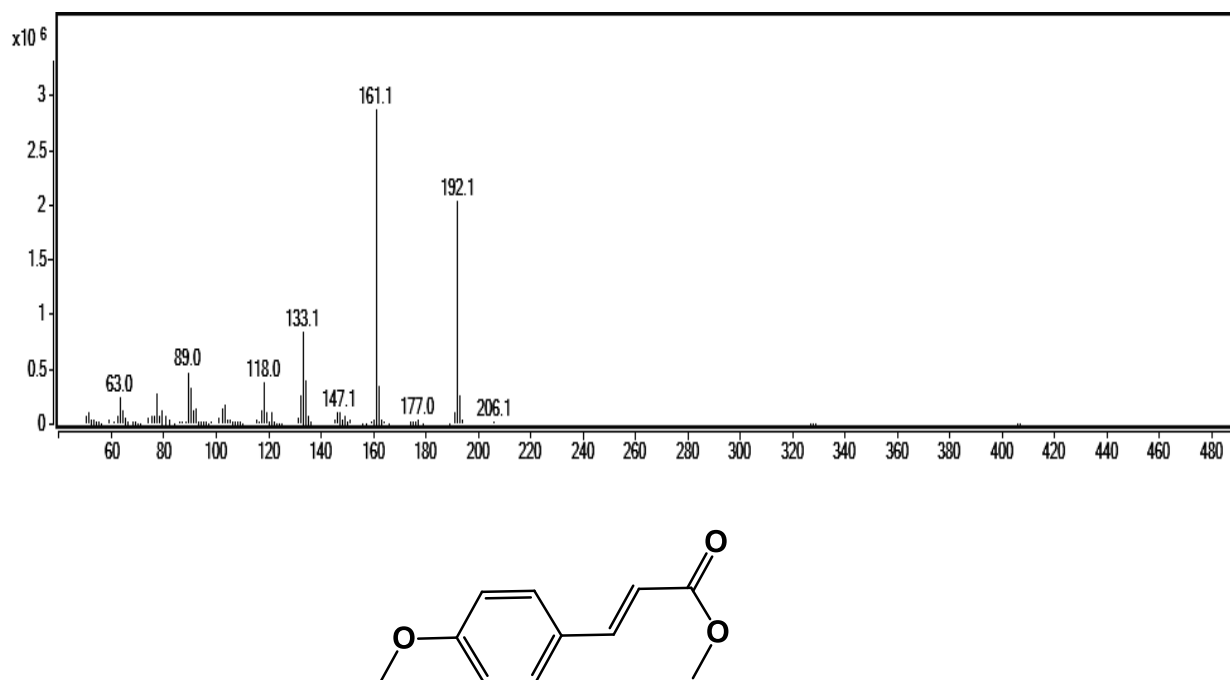


Figura A. A3. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido *p*-metoxicinâmico de acordo com a biblioteca NIST 11.

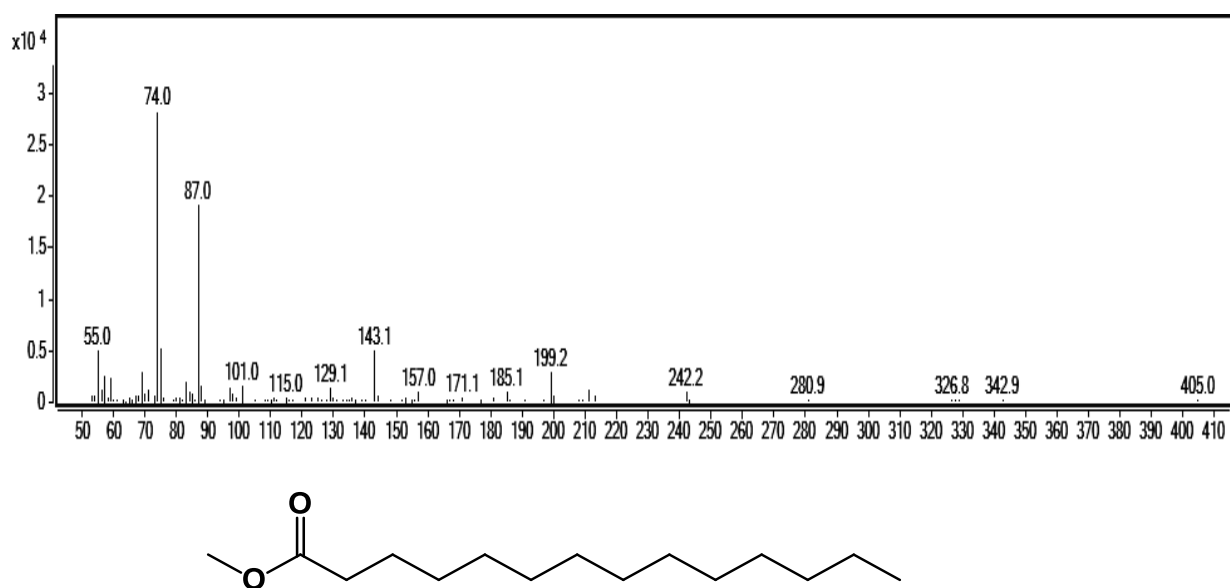


Figura A. A4. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido mirístico de acordo com a biblioteca NIST 11.

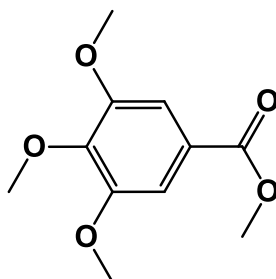
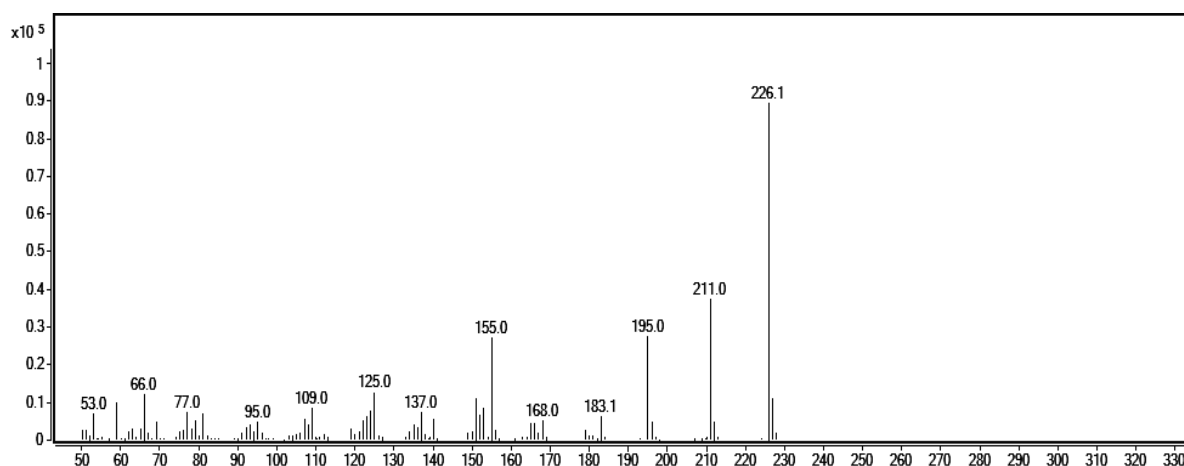


Figura A. A5. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico de acordo com a biblioteca NIST 11.

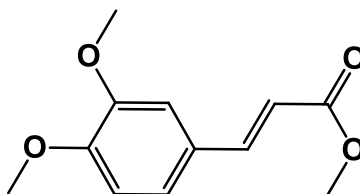
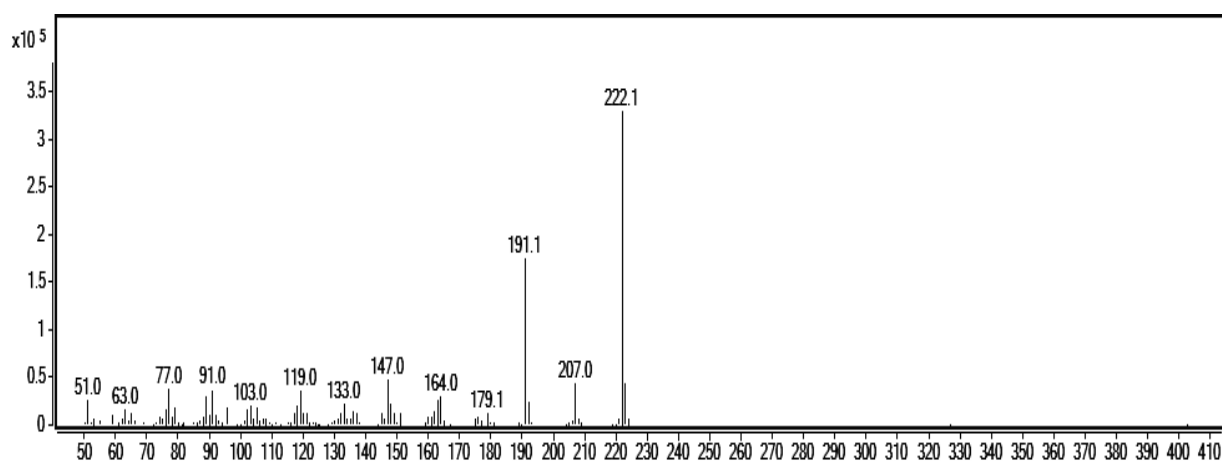


Figura A. A6. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido 3,4-dimetoxicinâmico de acordo com a biblioteca NIST 11.

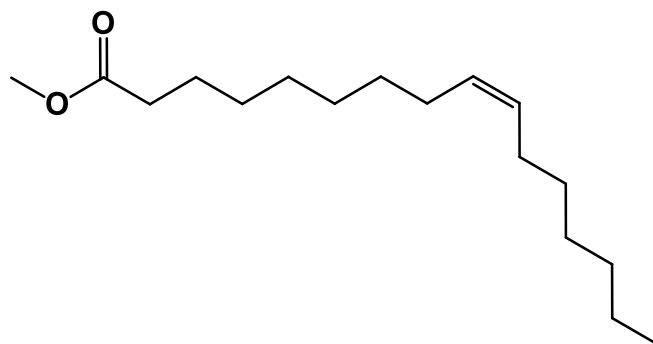
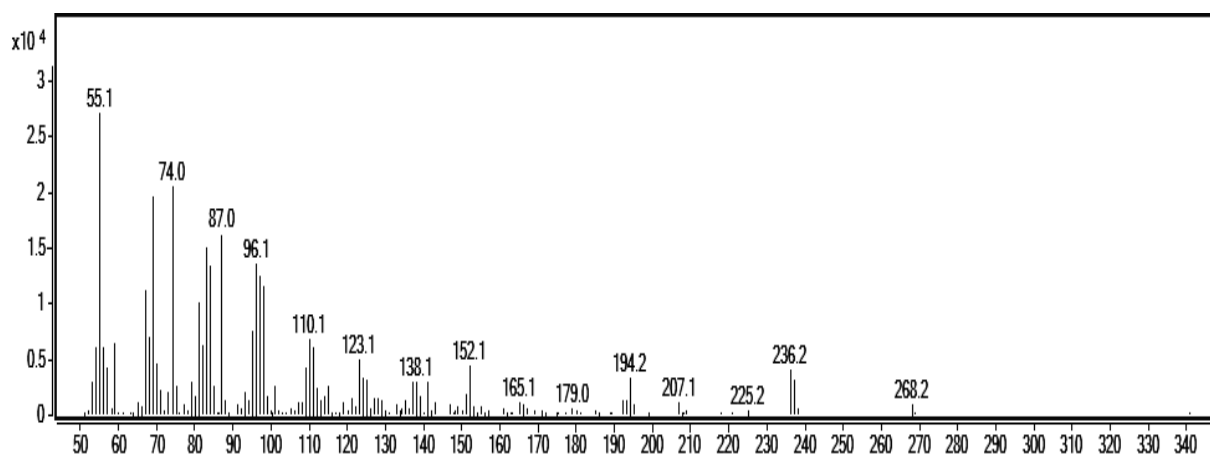


Figura A. A7. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido palmítoleico de acordo com a biblioteca NIST 11.

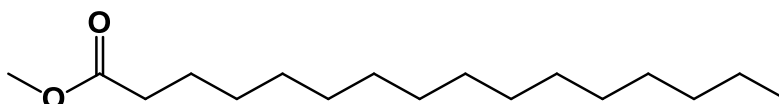
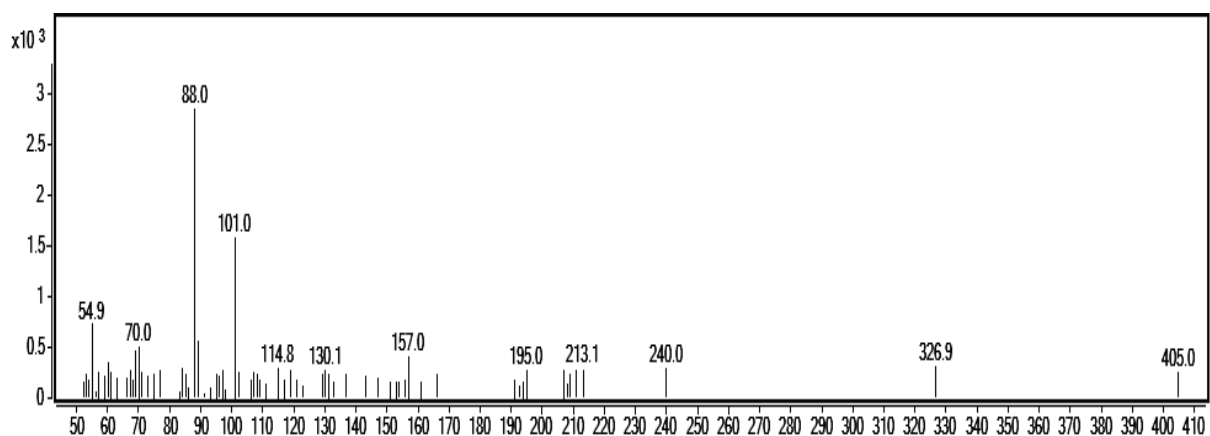


Figura A. A8. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido palmítico de acordo com a biblioteca NIST 11.

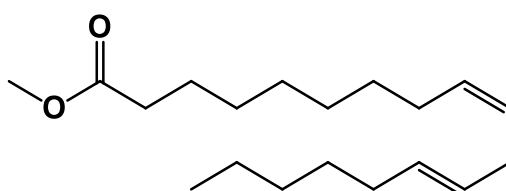
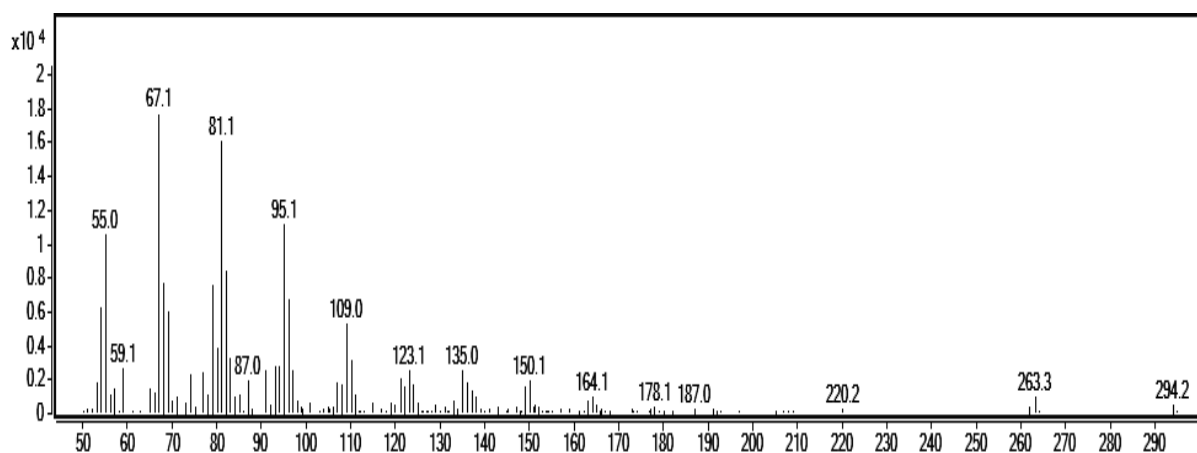


Figura A. A9. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido linoleico de acordo com a biblioteca NIST 11.

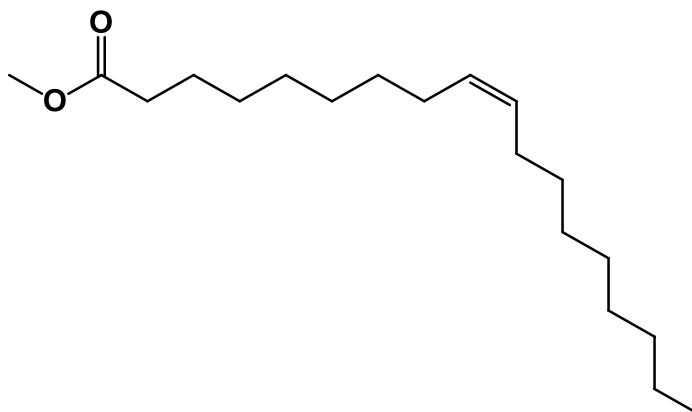
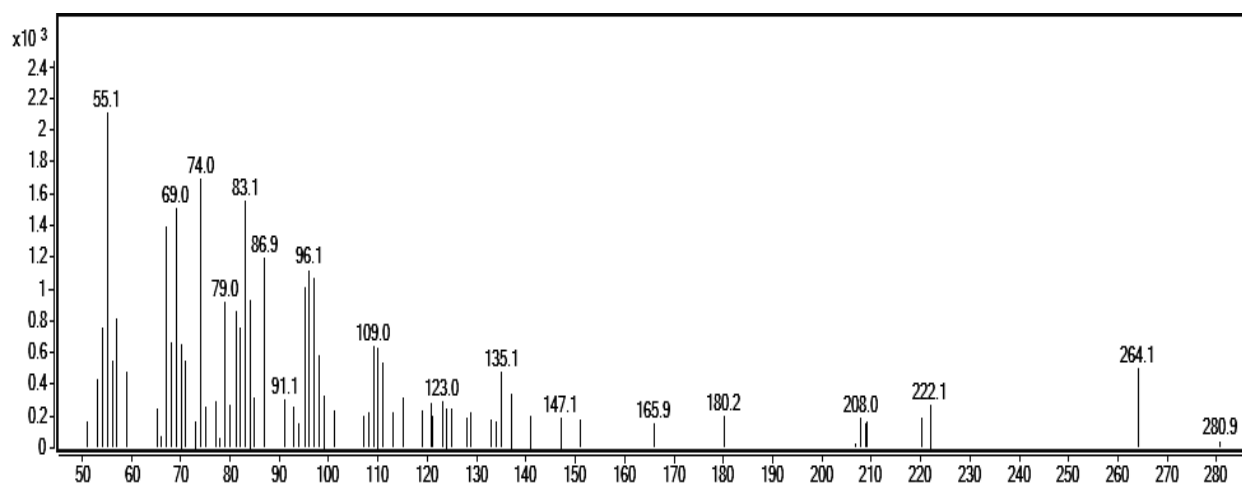


Figura A. A10. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido oleico de acordo com a biblioteca NIST 11.

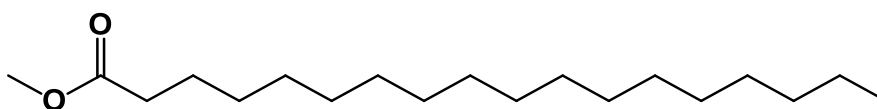
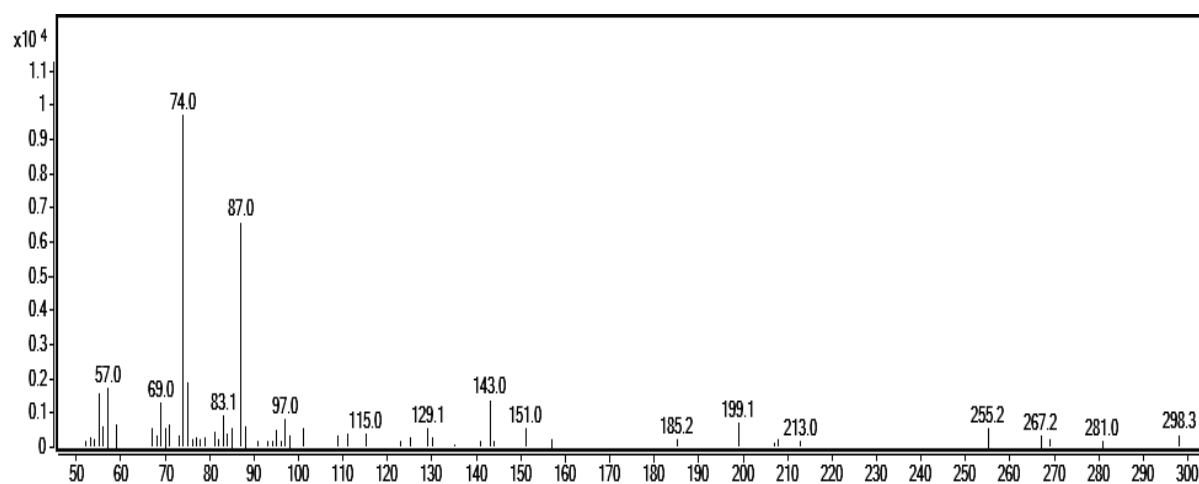


Figura A. A11. Espectro de massas referente ao éster metílico do ácido estearico de acordo com a biblioteca NIST 11.