

### Uso da Cromatografia *Flash* para a Separação dos Principais Componentes do Líquido da Castanha-de-caju Técnico, em Escala Preparativa

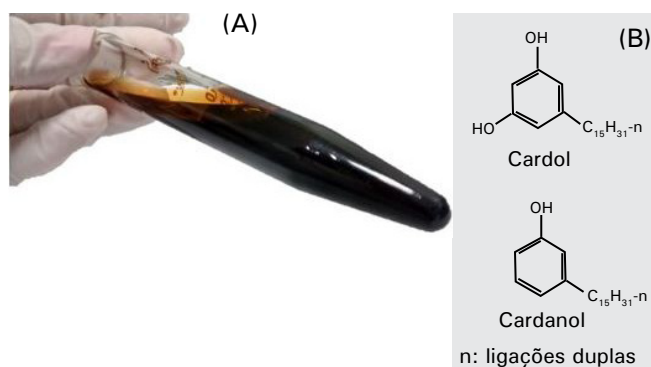
Lorena Mara Alexandre e Silva<sup>1</sup>  
Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro<sup>2</sup>  
Tigressa Helena Rodrigues<sup>3</sup>  
Edy Sousa de Brito<sup>4</sup>  
Kirley Marques Canuto<sup>5</sup>  
Guilherme Julião Zocolo<sup>6</sup>

Foto: Lorena Maria A. Silva



A castanha-de-caju é um dos mais importantes insumos agroindustriais do Ceará, sendo dela aproveitada comercialmente a amêndoa e um líquido escuro, conhecido por líquido da casca da castanha-de-caju (LCC), que representa aproximadamente 25% do peso da castanha e é considerado um coproduto do agronegócio do caju (MAZZETO et al., 2009). O LCC pode ser classificado como LCC natural, por conter uma grande quantidade de ácidos anacárdicos e não apresentar material polimérico em sua composição, e LCC técnico (Figura 1a), que apresenta um elevado percentual de cardanol, cardol (Figura 1b), além de material polimérico (GEDAM;

SAMPATHKUMARAN, 1986) e baixa quantidade de ácidos anacárdicos (MAZZETTO et al., 2009).



**Figura 1.** LCC técnico (A) e estruturas químicas do cardol e cardanol (B).

<sup>1</sup> Bacharel em Química, D.Sc. em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, [lorena.mara@embrapa.br](mailto:lorena.mara@embrapa.br)

<sup>2</sup> Bacharel em Química, M.Sc. em Química, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, [paulo.riceli@embrapa.br](mailto:paulo.riceli@embrapa.br)

<sup>3</sup> Engenheira química, D.Sc. em Engenharia Química, técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, [tigressa.helena@embrapa.br](mailto:tigressa.helena@embrapa.br)

<sup>4</sup> Químico industrial, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, [edy.brito@cnpq.embrapa.br](mailto:edy.brito@cnpq.embrapa.br)

<sup>5</sup> Farmacêutico, D.Sc. em Química de Produtos Naturais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, [kirley.canuto@embrapa.br](mailto:kirley.canuto@embrapa.br)

<sup>6</sup> Bacharel em Química, D.Sc. em Química analítica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, [guilherme.zocolo@embrapa.br](mailto:guilherme.zocolo@embrapa.br)

O cardol e o cardanol apresentam potencial valor comercial, já que exibem atividades biológicas como citotoxicidade e proteção ao estresse oxidativo induzido por danos fisiológicos, além de auxiliarem no combate a desordens neurodegenerativas tais como doenças de Alzheimer e Parkinson (HEMSHEKHAR et al., 2011). O LCC também é utilizado na indústria de surfactantes e aditivos (AGOSTINI-COSTA et al., 2000; CORREIA et al., 2006) e na agricultura, por apresentar atividade inseticida e fungicida (ASOGWA et al., 2007). Ademais, o cardanol é utilizado principalmente na indústria polimérica, pois auxilia no processamento dos polímeros (KUMAR et al., 2002). Em 2004, um método de pirólise do LCC foi proposto para obter um óleo isento de ácidos anacárdicos, miscível em diesel e com baixa corrosividade, potencialmente útil como combustível (DAS et al., 2004).

Vários métodos têm sido propostos para a separação dos componentes do LCC. Dentre eles, a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais utilizada. Rodrigues et al. (2011) utilizaram a CLAE para avaliar a composição do LCC oriundo de diferentes métodos de extração. Andrade et al. (2011) utilizaram a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para identificar os principais constituintes do LCC e correlacionar com atividades antioxidantes. Yuliana et al. (2014) realizaram a separação dos isômeros estruturais saturados do cardol, cardanol e ácidos anacárdicos do LCC natural por cromatografia em fase líquida, com posterior caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H).

A cromatografia *flash* (CFL) é um método de separação que utiliza baixas pressões para impelir a fase móvel através da fase estacionária, composta de partículas de sílica menores (70 mesh a 230 mesh) que as tradicionalmente utilizadas na cromatografia clássica de coluna (230 mesh a 400 mesh). Além disso, são utilizadas colunas de pequeno porte para obter separações mais rápidas. É uma técnica menos eficiente que a CLAE em termos de resolução e reprodutibilidade, mas pode rapidamente garantir a purificação de misturas a níveis aceitáveis (STEVENS JUNIOR; HILL, 2009). Desse modo, a CFL apresenta vantagens tais como: rapidez na purificação de extratos (obtendo-se valores de pureza acima de 90%), baixo custo operacional (colunas e solventes mais acessíveis,

por exemplo) e equipamento de investimento relativamente baixo e facilmente escalonável (RANI et al., 2014). Assim, a cromatografia *flash* tem sido utilizada para purificar diversas matrizes (FREEMAN et al., 1990; MILLER; MAHONEY, 2012; HOBBS; YOUNG, 2013; PATSAVAS et al., 2013).

Diante do exposto, a presente metodologia se propõe a utilizar a cromatografia *flash* para a separação dos principais constituintes do LCC técnico (LCCT).

## Materiais Necessários

### Reagentes

- n-Hexano P.A., teor: 65%, Vetec
- Metanol P.A., teor: 99,8%, Dinâmica
- Diclorometano P.A., teor: 99,9%, Vetec

### Equipamentos e Vidrarias

- Balança analítica
- Pipeta automática (1.000  $\mu$ L)
- Placa para Cromatografia em Camada Delgada (CCD) Silicycle, de fase normal (sílica), com espessura de camada de 250  $\mu$ m, partículas de 10  $\mu$ m a 12  $\mu$ m de tamanho e agente indicador fluorescente F254
- Cuba de vidro
- Vortex
- Seringa de vidro de 250  $\mu$ L
- Sistema de purificação *flash* marca Varian, modelo 971-FP
- Tubos de ensaio
- Coluna de sílica Agilent *SuperFlash* SF10 – 4g/Si35 (49,4 x 14,2 mm, 32  $\mu$ m) de pressão máxima de trabalho de 200 psi. O fluxo utilizado foi de 8 mL/min e carga de amostra variando de 40 mg a 400 mg.

## Preparo da amostra

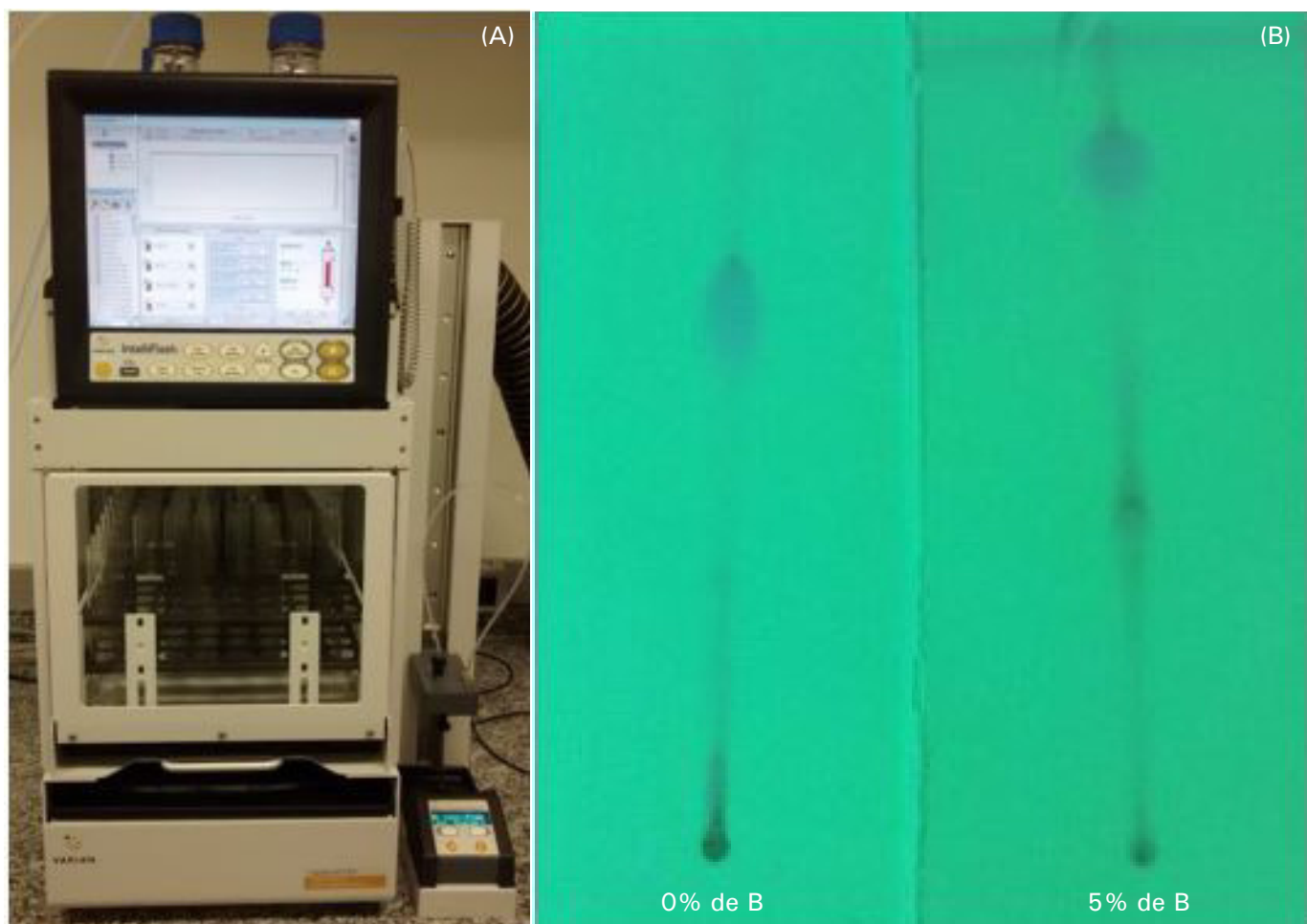
O LCC técnico (LCCT) foi fornecido pela Companhia Industrial de Óleos do Nordeste (Cione), Fortaleza, CE. Para a definição das condições de separação, foram pesados 51,7 mg do LCCT e dissolvidos em hexano sem a realização de qualquer filtração. Para estabelecer a capacidade de carga da coluna e estudar a transposição do método para a escala

preparativa, soluções de diferentes concentrações e diferentes volumes de injeção foram preparadas e injetadas (Tabela 2). Assim, foram injetados 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$ , 1.000  $\mu\text{L}$  e 5.000  $\mu\text{L}$  de uma solução de 51,7 mg/mL de LCC em hexano e, por fim, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg e 500 mg de amostra foram dissolvidos em 1 mL de hexano para posterior injeção.

## Protocolo do Método

Primeiramente, foi utilizado um recurso disponível no software controlador do equipamento (IntelliFlash) (Figura 2a) para a escolha das condições ideais de

separação. Assim, ao inserir a quantidade de amostra a ser injetada, o programa estima a utilização de diversas colunas, sendo a SF10 – 4g/Si35, com vazão de 8 mL/min, a selecionada. Para realizar a escolha da fase móvel, foram realizados testes em placas de cromatografia de camada delgada (CCD). Os solventes que proporcionaram melhores separações foram o diclorometano (A) e o metanol (B). Para desenvolver o método cromatográfico, duas corridas em CCD foram realizadas: uma com 100% de A e outra com 95:5 de A:B (Figura 2b). Os fatores de retenção (R<sub>f</sub>s) obtidos nas placas foram inseridos no programa, e um método foi proposto pelo software.



Fotos: Lorena Maria A. Silva

**Figura 2.** Equipamento de cromatografia *flash* (A) e Placas de CCD a 254 nm, utilizadas para realizar a escolha do método cromatográfico (B).

O método foi aprimorado, resultando no modo de eluição isocrático seguido por um gradiente, como segue: isocrático por 2 minutos a 0% B; gradiente de 0% a 67% de B em 8 minutos (taxa de incremento de 8,37%/min), seguido por

2 minutos de limpeza e equilíbrio da coluna. Foram utilizados os comprimentos de onda de 254 nm e 274 nm, os quais apresentaram maior absorbância em relação ao analito. Para a coleta automática das amostras, foi empregado um volume de 100  $\mu\text{L}$

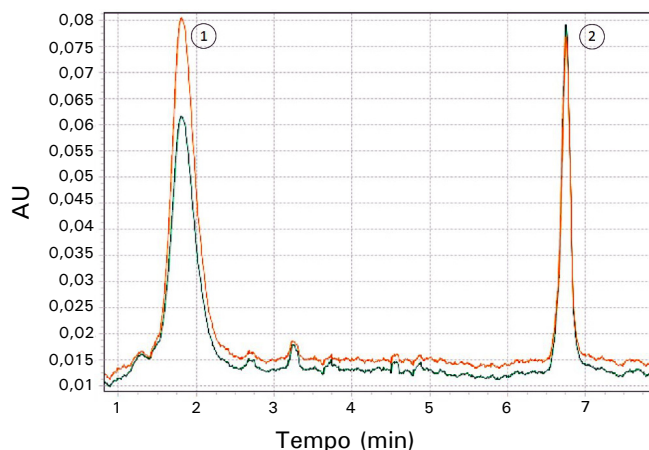
por injeção. As frações coletadas foram secas, solubilizadas em 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{CDCl}_3$  e analisadas por RMN unidimensional em um espectrômetro Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de  $^1\text{H}$ ), equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P), de detecção inversa e gradiente de campo no eixo "z".

Visando obter informações sobre a capacidade de separação (resolução) da coluna bem como a relação massa/volume de injeção, diversas corridas cromatográficas foram realizadas variando-se o volume de injeção (concentração amostral constante) e concentração (volume de injeção constante). Assim, a resolução cromatográfica ( $R_s$ ) foi calculada e comparada.

## Resultados

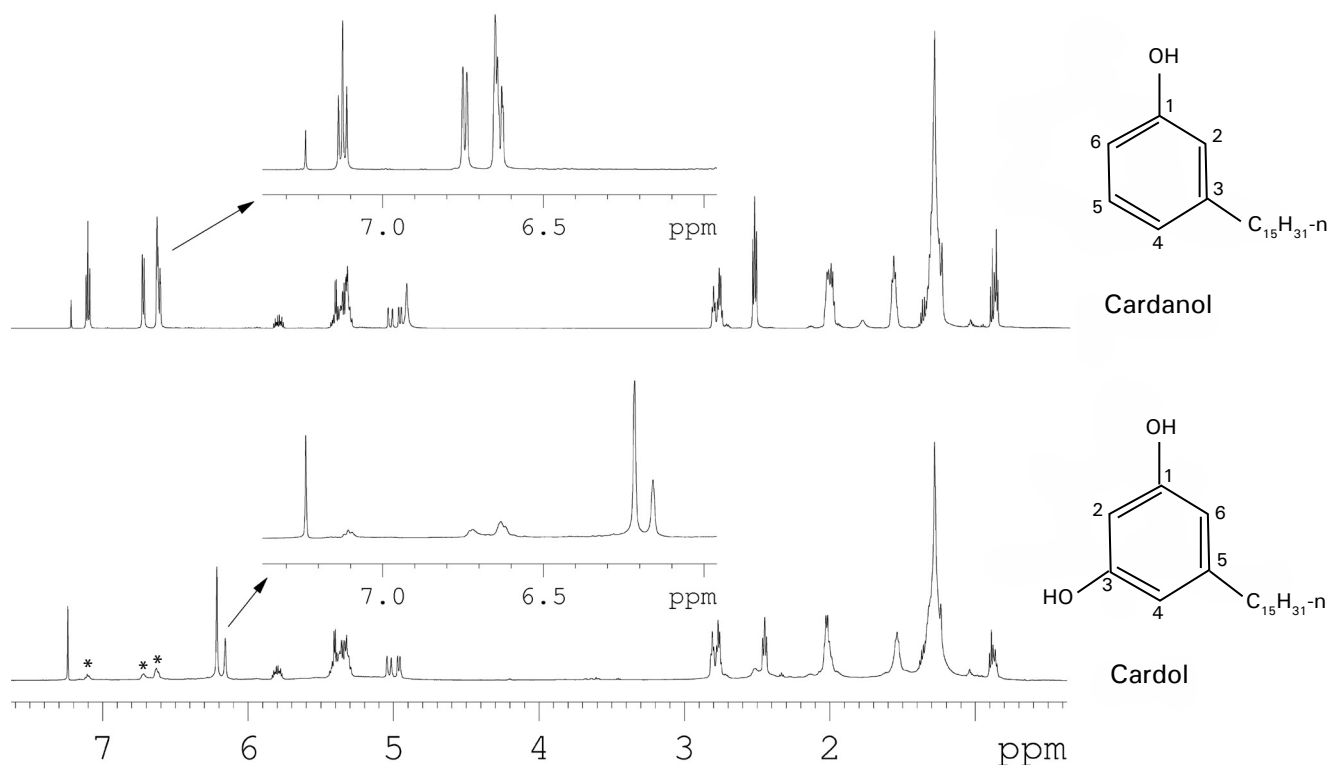
O sistema de cromatografia *flash* permitiu separar individualmente os constituintes principais do LCCT (Figura 3).

Para a separação dos principais constituintes do LCCT, obteve-se excelente resolução cromatográfica ( $R_s = 9$ ). As frações iniciais, finais e intermediárias, incluindo os picos obtidos, foram coletadas para o cálculo de recuperação, o qual foi de 95%.



**Figura 3.** Cromatograma obtido na separação do LCCT nos comprimentos de onda de 257 nm (amarelo) e 274 nm (verde). Pico 1: cardanol; pico 2: cardol.

Os dois picos principais foram analisados por RMN de hidrogênio (Figura 4). Após comparações com dados reportados em recentes trabalhos (YULIANA et al., 2014), os compostos foram caracterizados como cardanol ( $t_r = 1,9$  min, 30,5 mg) e cardol ( $t_r = 6,9$  min, 9,7 mg), correspondendo respectivamente a 65,6% e 20,8% do LCCT. Na Tabela 1, estão apresentados os dados de RMN para os hidrogênios aromáticos do cardanol e do cardol.



**Figura 4.** RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do cardanol e cardol com as respectivas expansões da região aromática.

\* Resíduos do cardanol.

**Tabela 1.** Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  para o cardanol e cardol.

Cardanol n° hidrogênio	$^1\text{H}$ : mult, $\delta$ em ppm; (J - Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	155,4
2	t; 7,14 (7,8)	129,2
3	-	137,3
4	d; 6,76 (7,8)	121,0
5	m; 6,62-6,69	115,5
6	m; 6,62-6,69	112,6

Cardol n° hidrogênio	$^1\text{H}$ : mult, $\delta$ em ppm; (J - Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	156,7
2	s; 6,23	108,2
3	-	156,7
4	s; 6,23	108,2
5	-	137,08
6	s; 6,15	100,1

Visando transpor o método para a escala preparativa, foi realizado um estudo variando a massa e o volume de amostra aplicados. Na Tabela 2, estão apresentados os tempos de retenção dos compostos e as respectivas resoluções obtidas quando foram variados o volume de injeção (concentração de 51,7 mg/mL) e concentração da amostra (volume de injeção de 1 mL).

**Tabela 2.** Tempos de retenção e resolução cromatográfica dos picos 1 e 2 observados nas separações variando-se volume e massa de amostra.

Volume ( $\mu\text{L}$ ) (Concentração 51,7 mg/mL)	$t_{R1}^{(1)}$	$t_{R2}^{(2)}$	$R_s^{(3)}$
100	1,5	6,7	9,5
200	2,2	6,8	6,6
300	2,0	6,7	8,5
500	2,0	6,7	7,2
1.000	1,7	6,7	5,6
5.000	1,67	6,75	5,3

Massa (mg) (Volume de 1 mL)	$t_{R1}$	$t_{R2}$	$R_s$
50	1,7	6,7	5,6
100	1,7	7,2	5,8
200	1,7	6,9	4,7
300	1,6	6,8	6,5
500	1,5	6,8	5,6

<sup>(1)</sup>  $t_{R1}$ : tempo de retenção do pico 1; <sup>(2)</sup>  $t_{R2}$ : tempo de retenção do pico 2;  
<sup>(3)</sup>  $R_s$ : resolução cromatográfica.

O primeiro parâmetro avaliado foi o volume de injeção de uma solução de 51,7 mg/mL. Pode-se observar que houve maior perda de resolução quando o volume de injeção foi maior do que 1 mL. Ao aumentar demasiadamente o volume de injeção, bandas cromatográficas cada vez mais largas são inseridas na coluna causando migrações diferenciais, difusão de Eddy e consequente perda de resolução. Além disso, a amostra, ao ser injetada, deve encontrar um ambiente (fase estacionária/fase móvel) homogêneo para que a separação ocorra. Assim, o solvente no qual a amostra foi preparada (hexano) começa a interferir na separação, causando distorções nos picos. O segundo parâmetro avaliado foi a massa com o volume de injeção constante de 1 mL. Nesse caso, a resolução foi menor logo na primeira injeção devido ao volume de injeção de 1 mL escolhido. Assim, a resolução manteve-se razoável no decorrer das injeções, indicando que não houve sobrecarga de amostra mesmo com a injeção de 500 mg de extrato.

De maneira geral, a resolução inerente à separação cromatográfica obtida permite a injeção de 500 mg de LCCT, sem coeluição dos picos. Desse modo, pode-se obter 325 mg de cardanol, com alta pureza (aproximadamente 99%) e em uma única injeção.

## Conclusão

A cromatografia *flash* é uma técnica simples e permite a realização de separações rápidas e de forma preparativa. Estes resultados demonstraram que tal técnica é eficaz para o fracionamento do LCCT, já que os compostos isolados, apesar de estruturalmente semelhantes, puderam ser separados com boa resolução e em um curto tempo de corrida. Devemos ressaltar ainda a economia de tempo e dinheiro que pode ser alcançada com este método, já que a cromatografia *flash* é um método rápido, que possibilita a utilização de colunas empacotadas pelo próprio usuário, facilmente escalonável e de custo reduzido, uma vez que o equipamento requer um investimento menor e permite o uso de solventes mais baratos do que aqueles empregados na cromatografia líquida de alta eficiência.

## Referências

- AGOSTINI-COSTA, T. S.; SANTOS, J. R.; GARRUTI, D. S.; FEITOSA, T. Caracterização, por cromatografia em camada delgada, dos compostos fenólicos presentes em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Boletim do CEPPA**, v. 18, p. 129-137, 2000.
- ANDRADE, T. J. A. S.; ARAÚJO, B. Q.; CITÓ, A. M. G. L.; SILVA, J.; SAFFI, J.; RICHTER, M. F.; FERRAZ, A. B. F. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). **Food Chemistry**, v. 126, p. 1044-1048, 2011.
- ASOGWA, E. U.; MOKWUNYE, I. U.; YAHAYA, L. E.; AJAO, A. A. Evaluation of cashew nut shell liquid (CNSL) as a potential natural insecticide against termites (soldiers and workers castes). **Research Journal of Applied Science**, v. 2, p. 939-942, 2007.
- CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, p. 1287-1300, 2006.
- DAS, P.; SREELATHA, T.; GANESH, A. Bio oil from pyrolysis of cashew nut shell-characterisation and related properties. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, p. 265-275, 2004.
- FREEMAN, H. S.; HAO, Z.; MCINTOSH, S. A.; POSEY JR., J. C.; HSU, W. N. Purification procedures for synthetic dyes: Part 4—*Flash* chromatography. **Dyes and Pigments**, v. 12, p. 233-242, 1990.
- GEDAM, P. H.; SAMPATHKUMARAN, P. S. Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 14, p. 115-157, 1986.
- HEMSHEKHAR, M.; SANTHOSH, M. S.; KEMPAIAH, K. AND GIRISH, K. S. Emerging roles of Anacardic Acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 122-132, 2011.
- HOBBS, A. N.; YOUNG, R. J. Practical purification of hydrophilic fragments and lead/drug-like molecules by reverse phase flash chromatography: tips, tricks and contemporary developments. **Drug Discovery Today**, v. 18, p. 148-154, 2013.
- KUMAR, P. P.; PARAMASHIVAPPA, R.; VITHAYATHIL, P. J.; RAO, P. V. S.; RAO, S. Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4705-4708, 2002.
- MAZZETO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha-de-caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, p. 732-741, 2009.
- MILLER, L.; MAHONEY, M. Evaluation of flash supercritical fluid chromatography and alternate sample loading techniques for pharmaceutical medicinal chemistry purifications. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 264-273, 2012.
- PATSAVAS, M.C.; BYRNE, R. H.; LIU, X. Purification of meta-cresol purple and cresol red by flash chromatography: Procedures for ensuring accurate spectrophotometric seawater pH measurements. **Marine Chemistry**, v. 150, p. 19-24, 2013.
- RANI, E. M.; SHILPA, K.; RAO, V. U. *Flash* chromatography and its advancement: an overview. **International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis**, v. 4, p. 328-334, 2014.
- RODRIGUES, F. H. A.; FRANÇA, F. C. F.; SOUZA, J. R. R.; RICARDO, N. M. P. S.; FEITOSA, J. P. A. Comparison between physico-chemical properties of the technical Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) and those natural extracted from solvent and pressing. **Polímeros**, v. 21, p. 156-160, 2011.
- STEVENS JR., W. C.; HILL, D. C. General methods for flash chromatography using disposable columns, **Molecular Diversity**, v. 13, p. 247-252, 2009.
- YULIANA, M.; NGUYEN-THI, B. T.; FAIKA, S.; HUYNH, L. H.; SOETAREDDJO, F. E.; JU, Y. H. Separation and purification of cardol, cardanol and anacardic acid f cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut-shell liquid using a simple two-step column chromatography. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 41, p. 2187-2193, 2014.

### Comunicado Técnico, 216

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



Unidade responsável pelo conteúdo e edição:  
**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (0xx85) 3391-7100  
Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7141  
E-mail: [www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

1ª edição (2015): disponibilizada on-line no  
formato PDF

### Comitê de Publicações

**Presidente:** Gustavo Adolfo Saavedra Pinto  
**Secretária-executiva:** Celli Rodrigues Muniz  
**Membros:** Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes.

### Expediente

**Supervisão editorial:** Marcos Antônio Nakayama  
**Revisão de texto:** Marcos Antônio Nakayama  
**Normalização bibliográfica:** Rita de Cássia Costa Cid  
**Editoração eletrônica:** Arilo Nobre de Oliveira