

# OPORTUNIDADES E DESAFIOS NA RECUPERAÇÃO E SEPARAÇÃO DE CAROTENÓIDES

**Cesar Costapinto Santana**  
**Claudio Dariva**  
**Elton Franceschi**  
**Kelvis Vieira Campos**  
**Luciana de Souza Guedes**  
**Marcia Cristina Breitzkreitz**  
**Isabel Cristina Fontes Jardim**

*GRAMADO – RS*  
*Abril de 2018*



## ESCOPO

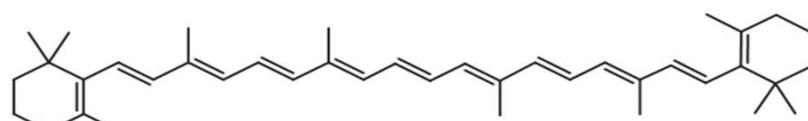
- Motivação para a separação de carotenoides**
- Adsorção em tanque agitado e em colunas**
- Adsorção em sistemas pressurizados**
- Uso de fluidos supercríticos em colunas com partículas de pequeno diâmetro : ultra alta eficiência (UHPSFC). Ultra High Performance Chromatography (UHPSFC)**
- Separação cromatográfica com colunas analíticas**
- Planejamento experimental para parâmetros de processo**
- Resultados com extrato bruto de óleo de dendê**
- Perspectivas futuras**



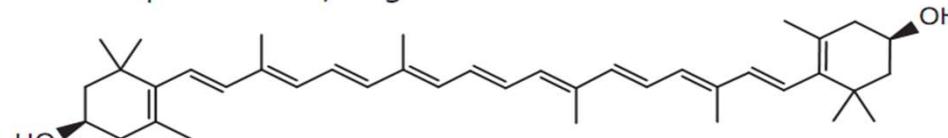
# CAROTENOIDES: FUNÇÕES E FONTES NATURAIS

Carotenoides formam uma importante classe de pigmentos naturais que são encontrados principalmente em plantas.

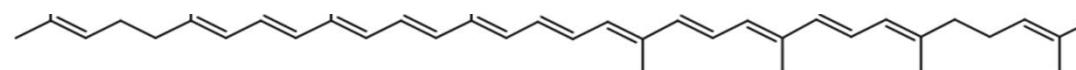
Além da atividade da pro-vitamin A esses compostos estão associados a um grande número de benefícios para a saúde como a capacidade antioxidante e a prevenção de cancer, diabetes e doenças cardiovasculares.



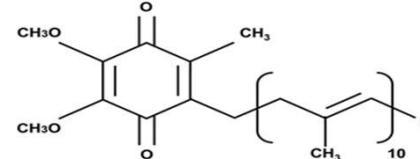
$\beta$ -carotene, LogP=11.68



Lutein, LogP=8.22



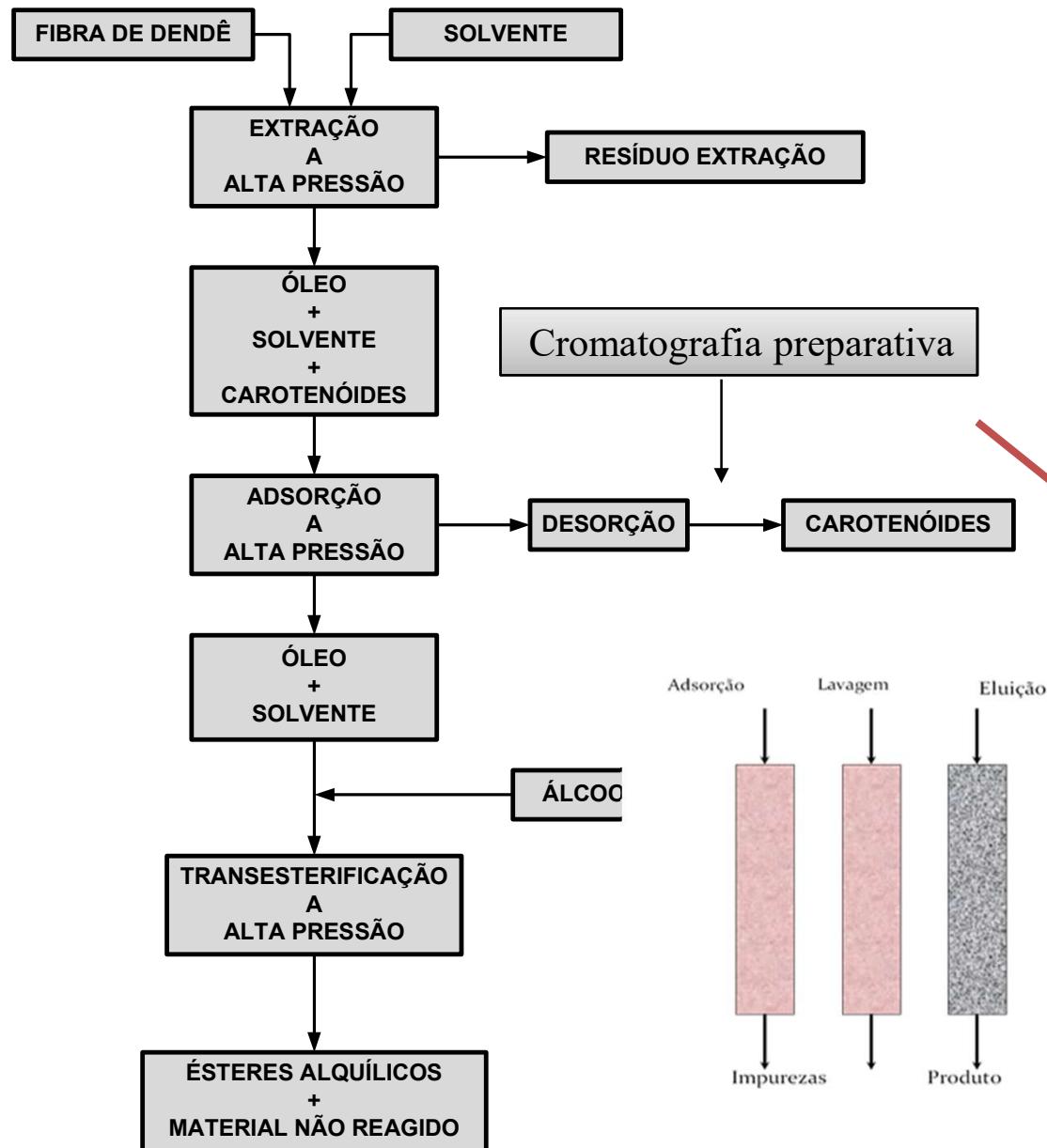
Lycopene, LogP=11.11



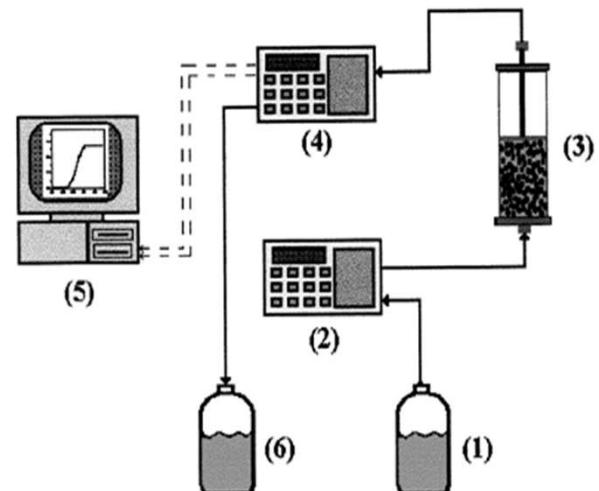
Coenzyme Q10, Log P = 11.00

Parâmetros P de solubilidade similares  
Temperatura e pressão desempenham  
também importante papel no projeto  
de processos de separação.

# CAROTENOIDES ORIGINÁRIOS DO ÓLEO DE DENDÊ :



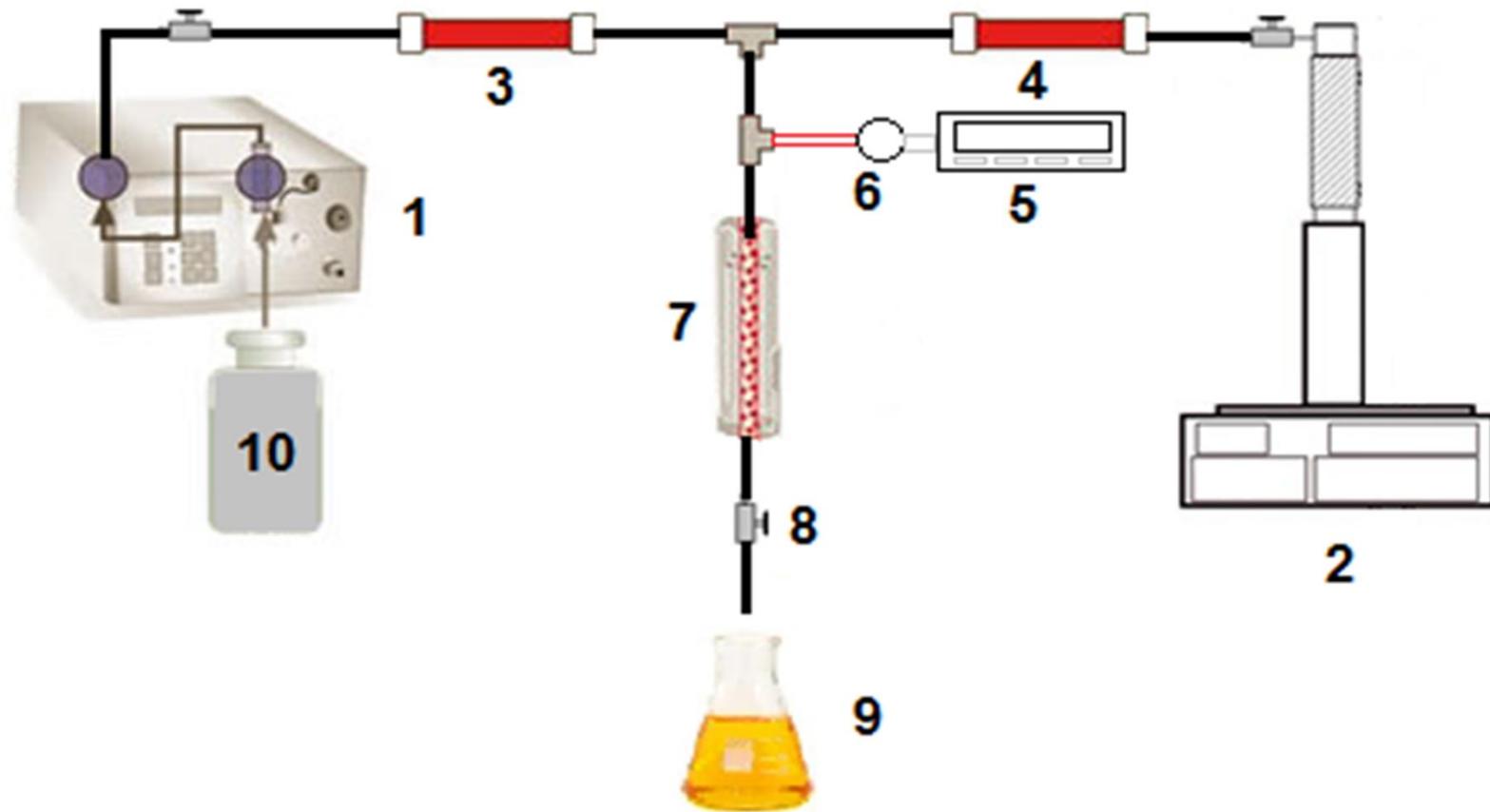
Produtos secundários de alto valor agregado na obtenção do biodiesel



# OBJETIVOS

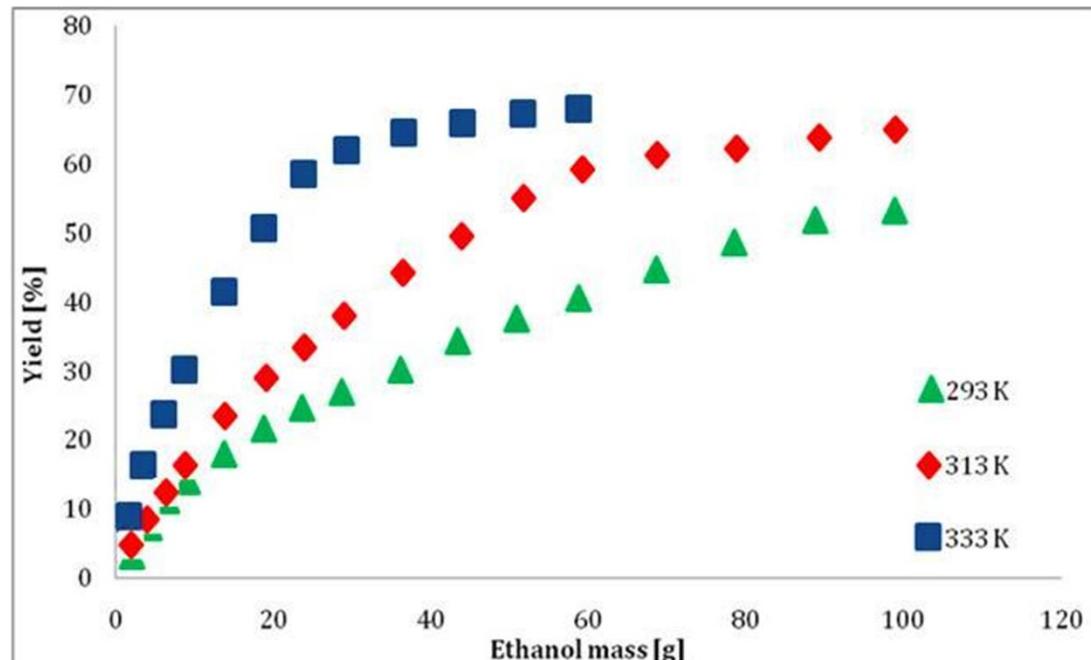
- O principal objetivo da apresentação é identificar oportunidades da recuperação de produtos de alto valor agregado como os carotenoides a partir de extratos de oleaginosas como o dendê.
- Nesse sentido é necessário estudar os fatores – chave que afetam a separação de misturas como licopeno, beta-caroteno, co-enzima Q10 e luteína por técnicas cromatográficas avançadas como a com fluido supercrítico de ultra alta eficiência (UHPSFC).
- Com a metodologia de planejamento experimental e respostas de superfície acoplada a experimentos em equipamento analítico avaliar as melhores condições de operação que possam levar a seletividade e retenções adequadas.
- Com a utilização de extratos brutos de óleo de dendê , compreender os métodos que permitam escalar o processo de separação com fluidos supercríticos

# EXTRAÇÃO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS DO ÓLEO BRUTO DE DENDÊ



Esquema Experimental - Extração com Propano e com Etanol Comprimidos

# EXTRAÇÃO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS DO ÓLEO BRUTO DE DENDÊ



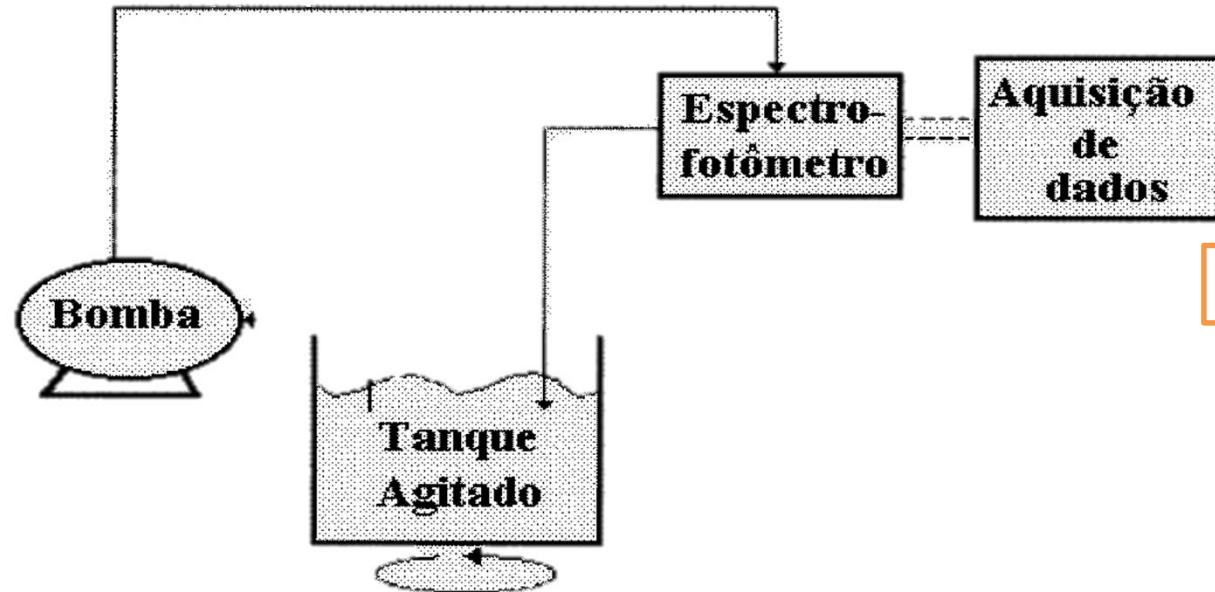
Temperatura de 313K, vazão de 2ml/min e 100 bar.

## Composição do Extrato por GC

Fatty acid (as triglycerides)	Concentration (%)
Palmitic	42
Oleic	35.4
Linoleic	9.4
Stearic	4.4
Myristic	0.8
Linolenic	0.3
Lauric	0.1

*Conteúdo de carotenoides: 0.6 mg/mL  
com base no β-caroteno.*

# ADSORÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO EM TANQUES AGITADOS



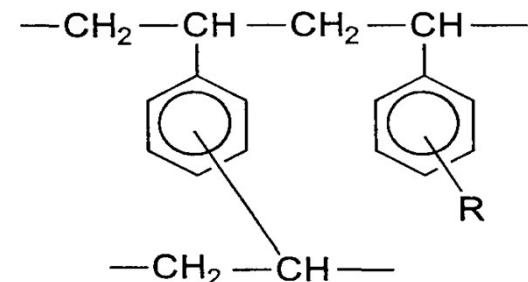
Balanço de Massa do Sóluto:

$$Q = \frac{(C_0 - C^*)V_L}{m_{ads}}$$

T = 293 K, Pressão: 1 bar;

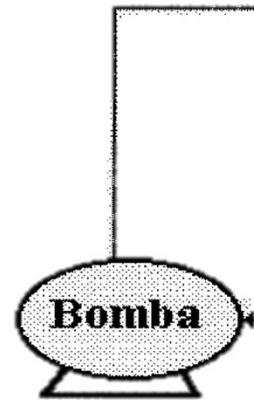
Esquema Experimental – Adsorção em Tanque Agitado

Interação Hidrofóbica

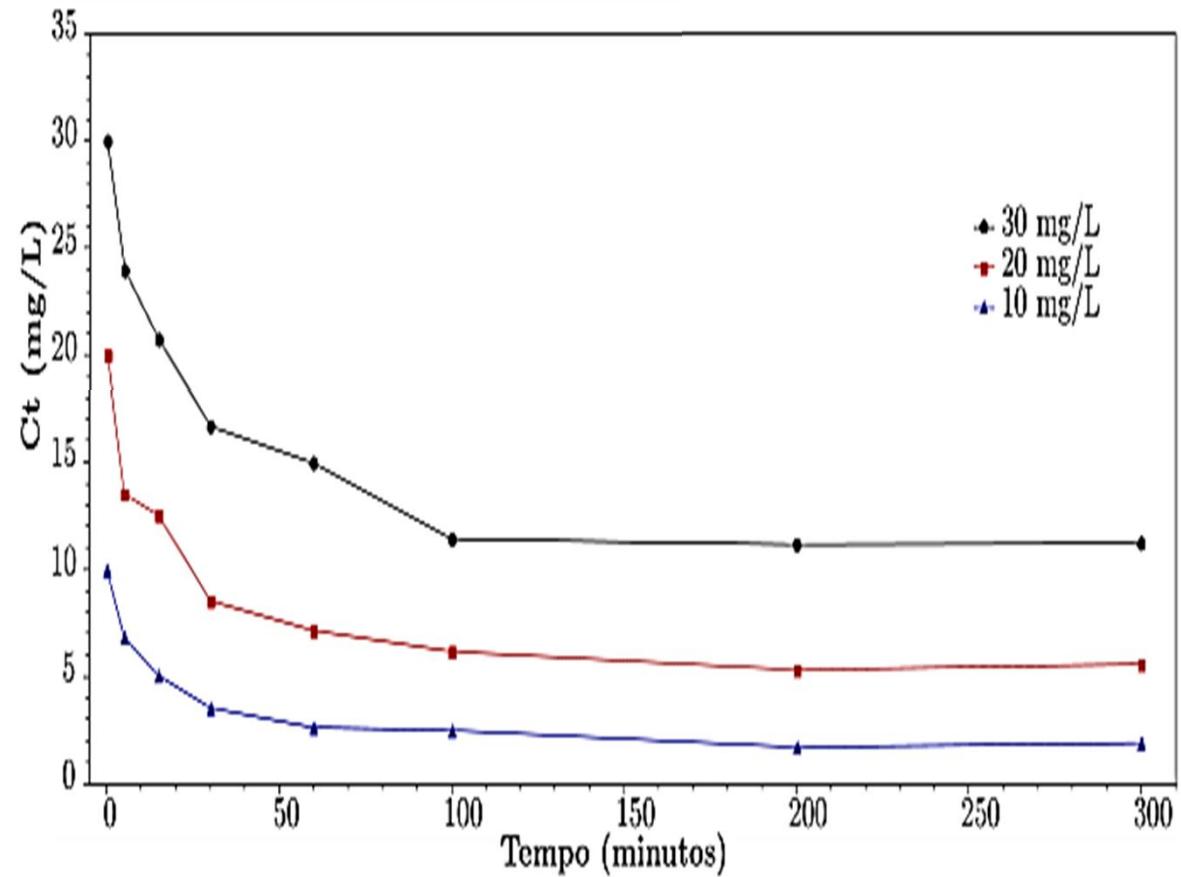


Resina poliaromática Diaion HP-20.

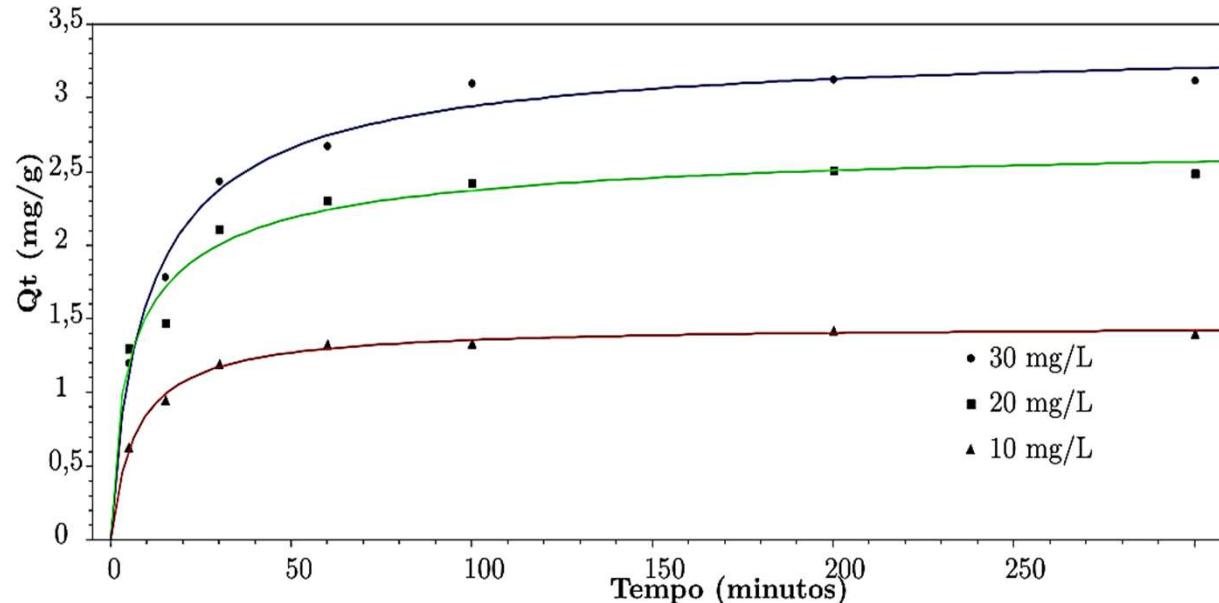
# ADSORÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO EM TANQUES AGITADOS



Esquema Experimental –  
Adsorção em Tanque Agitado

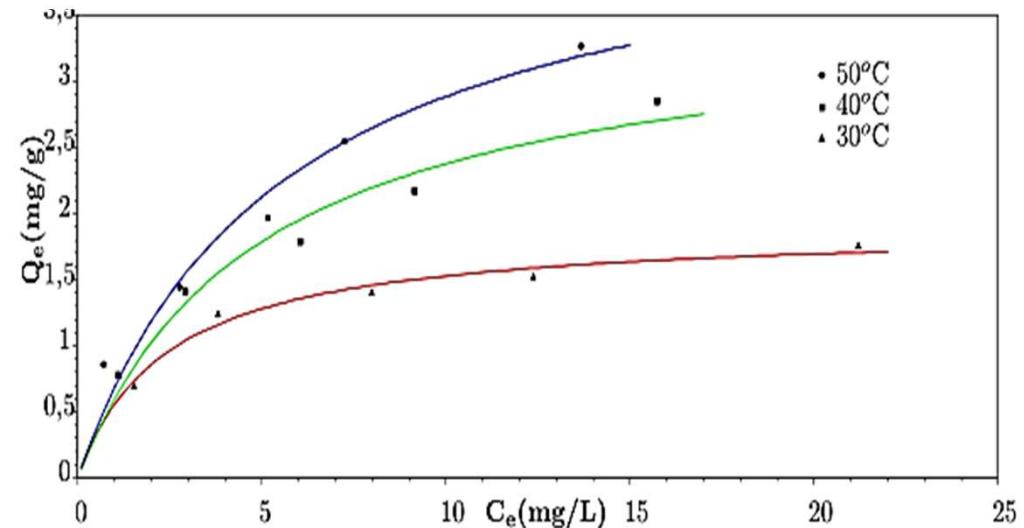


# QUANTIDADES ADSORVIDAS E ISOTERMA DE ADSORÇÃO PARA CAROTENO

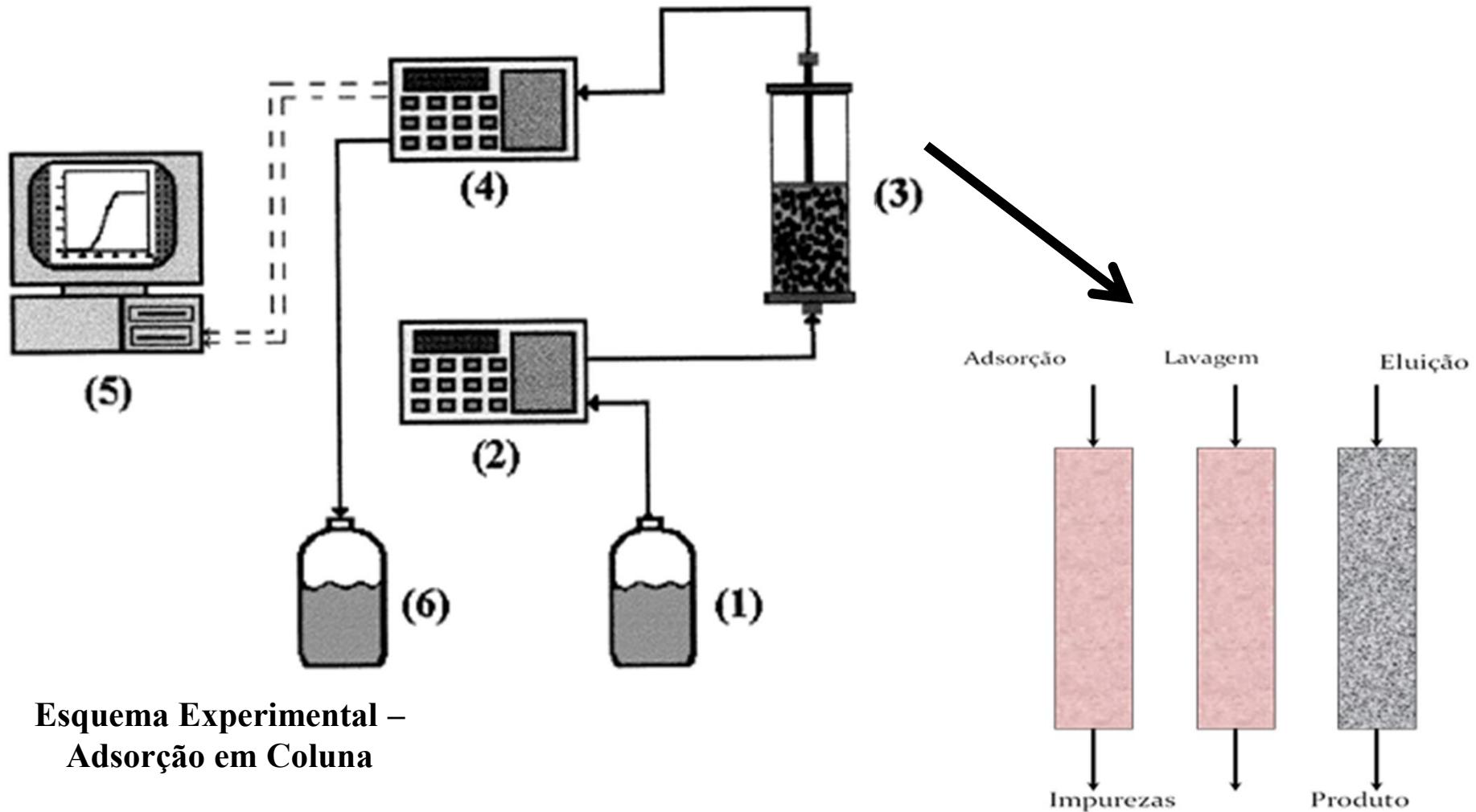


$$Q = \frac{(C_0 - C^*)V_L}{m_{ads}}$$

$$Q = \frac{q_m C^*}{k_d + C^*}$$

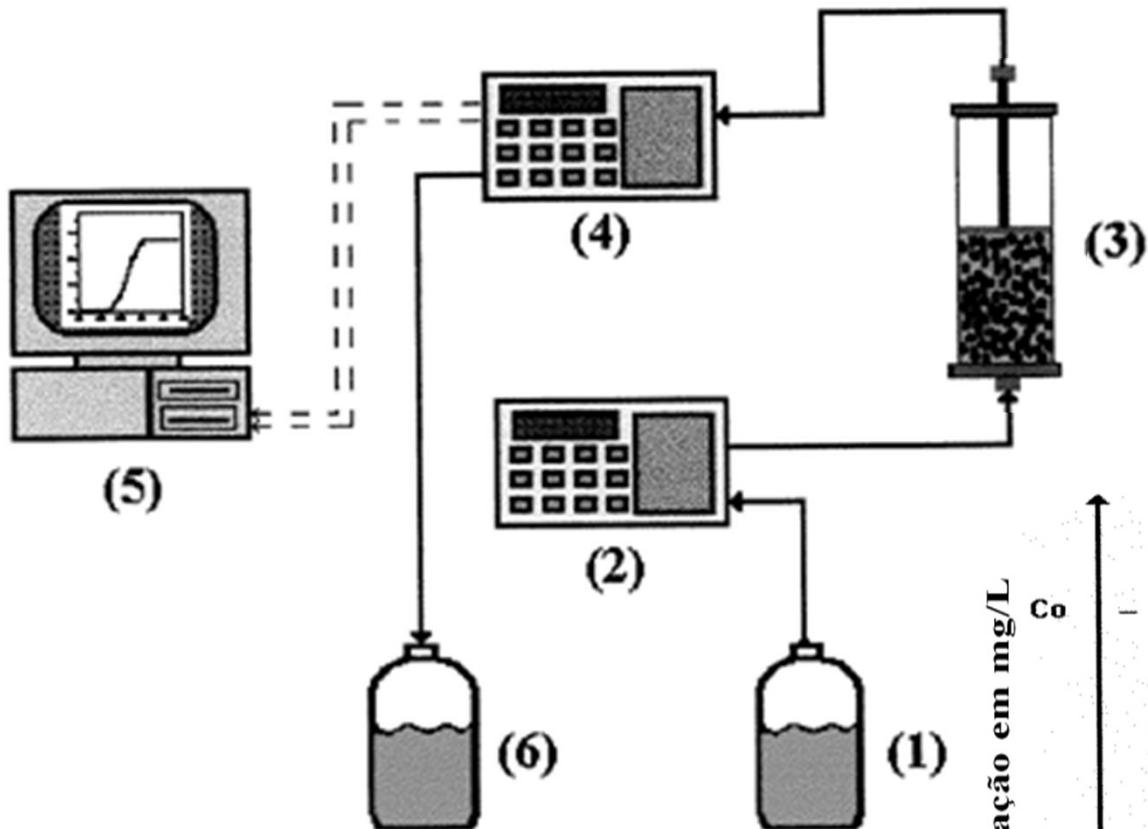


# ADSORÇÃO EM COLUNAS COM SOLVENTES LÍQUIDOS



Esquema Experimental –  
Adsorção em Coluna

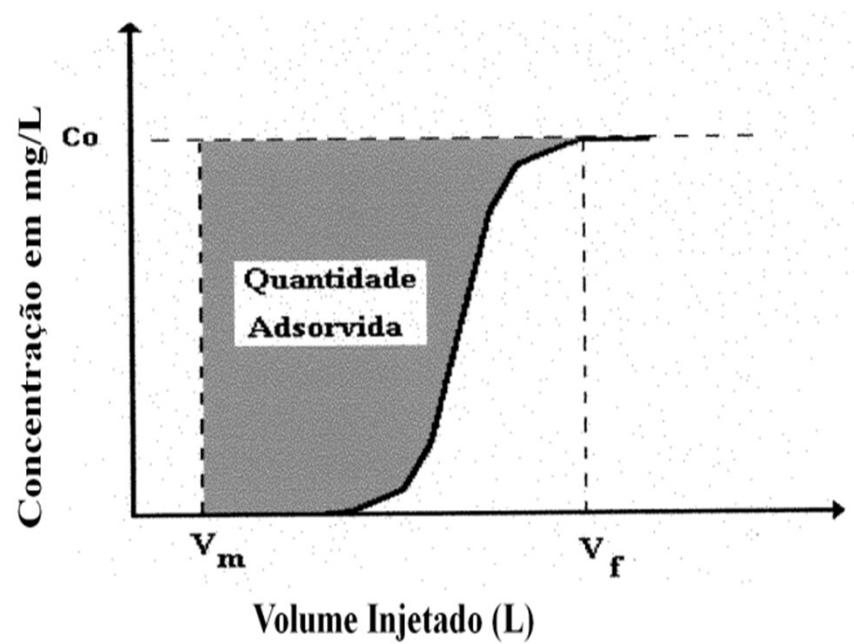
# ADSORÇÃO EM COLUNAS COM SOLVENTES LÍQUIDOS



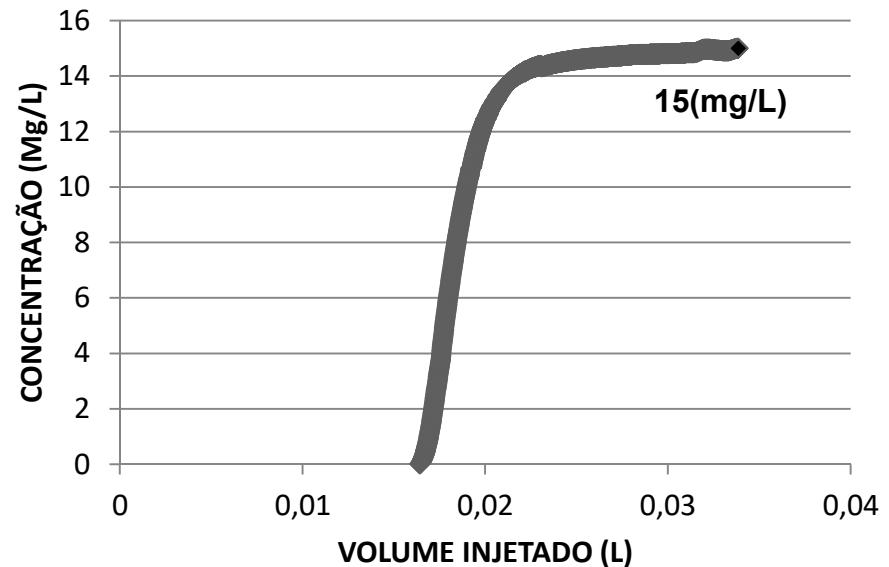
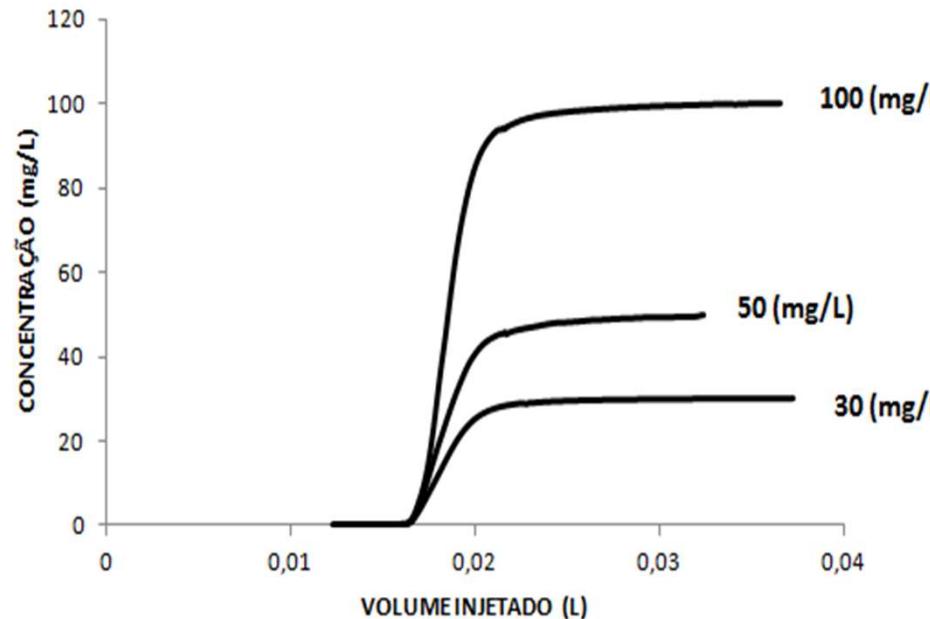
Esquema Experimental –  
Adsorção em Coluna

Balanço de massa do soluto:

$$Q = \frac{C_0(V_f - V_m) - \int_{V_m}^{V_f} C \, dV}{m_{ads}}$$

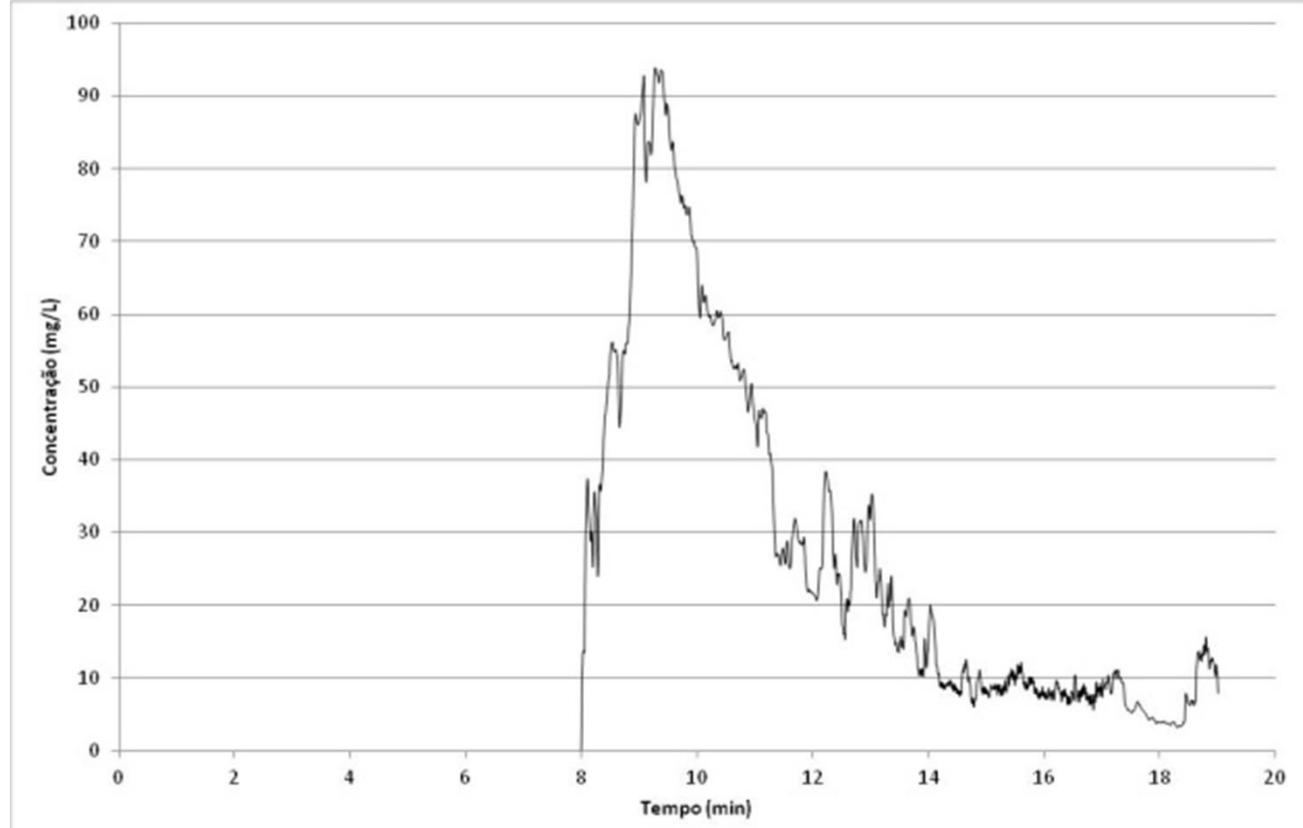
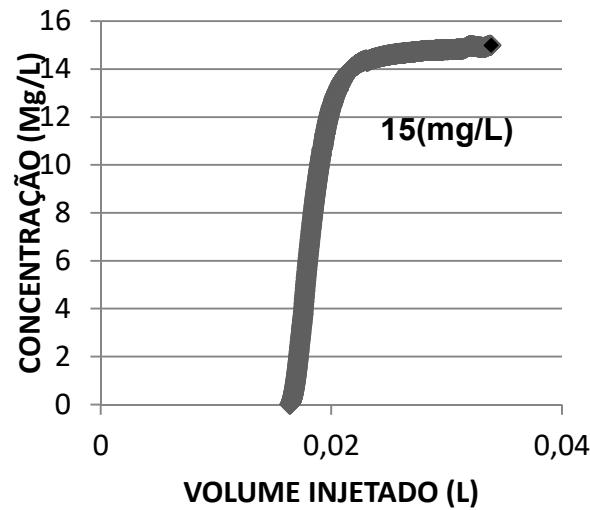


# ADSORÇÃO EM COLUNAS COM SOLVENTES LÍQUIDOS



**Adsorvente: (HP- 20 - Mitsubishi);**  
**Coluna de 1 cm de diâmetro e 20 cm de**  
**comprimento;**  
**T= 293 K;**  
**Diluente: Etanol.**

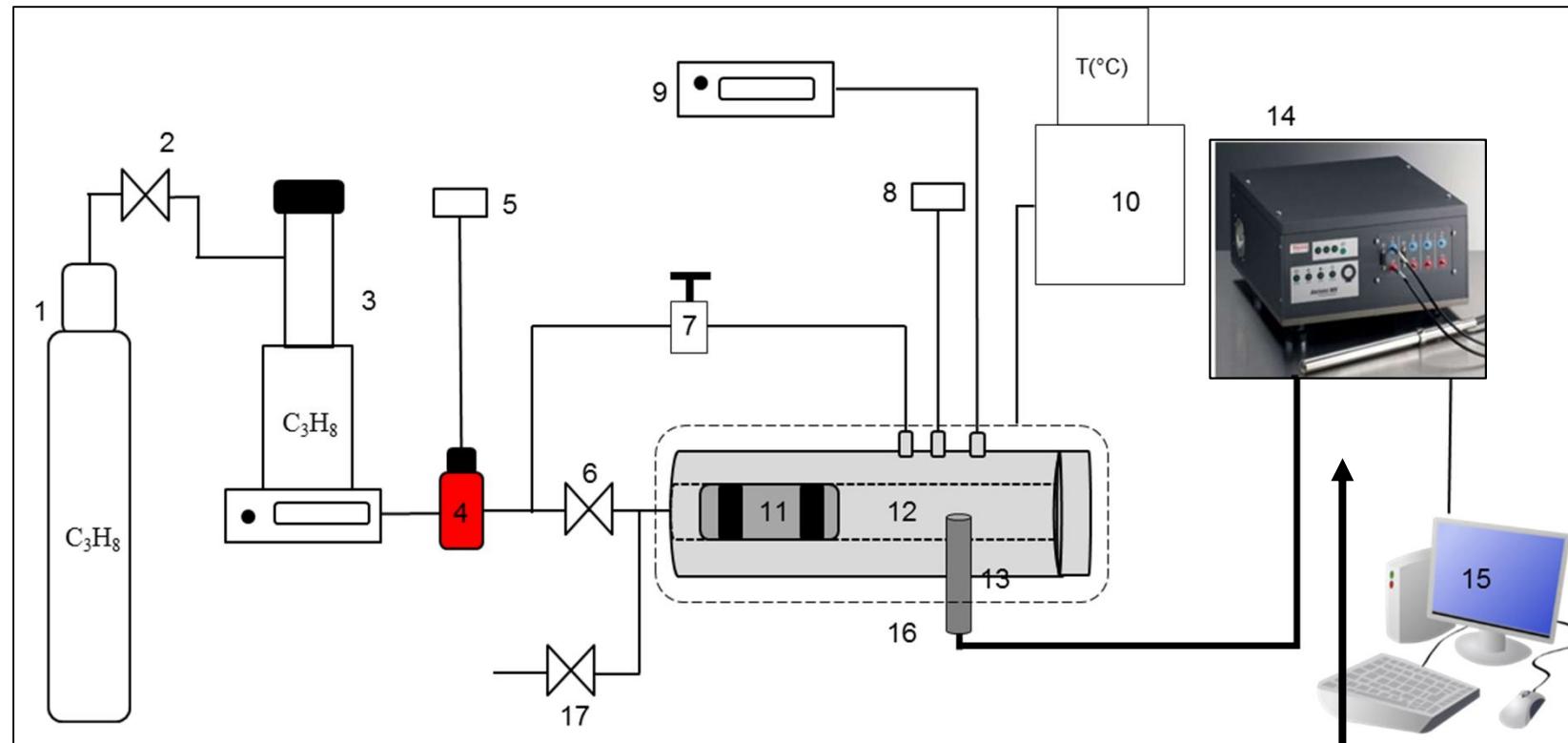
# ADSORÇÃO EM COLUNAS COM SOLVENTES LÍQUIDOS



**Adsorvente: (HP- 20 - Mitsubishi);**  
**Coluna de 1 cm de diâmetro e 20 cm de**  
**comprimento;**  
**T= 293 K;**  
**Diluente: Etanol.**

**Eluição com benzeno**  
**Recuperação de 70% em massa**

# ADSORÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO EM SISTEMAS PRESSURIZADOS

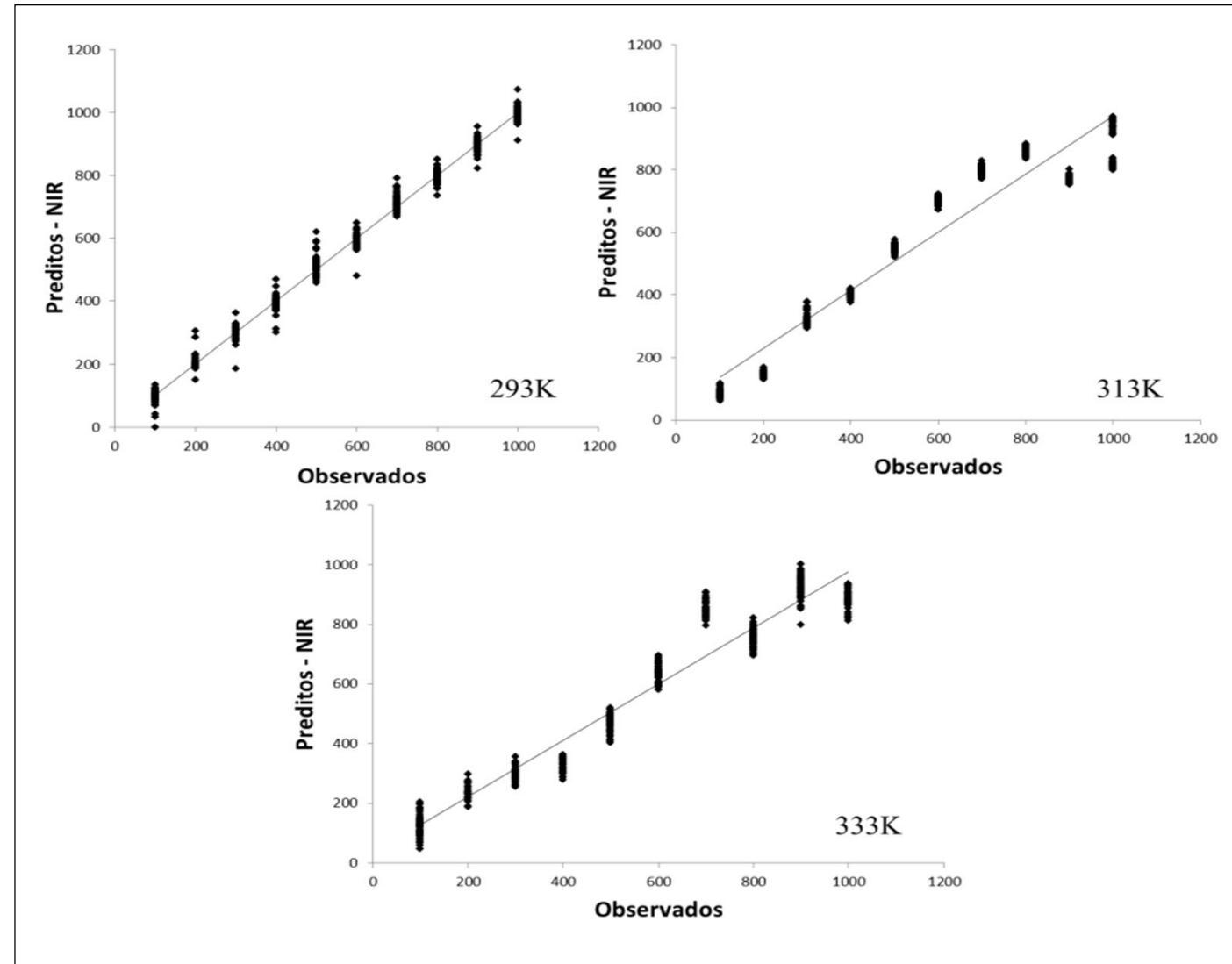


Esquema Experimental – Adsorção em sistema pressurizado

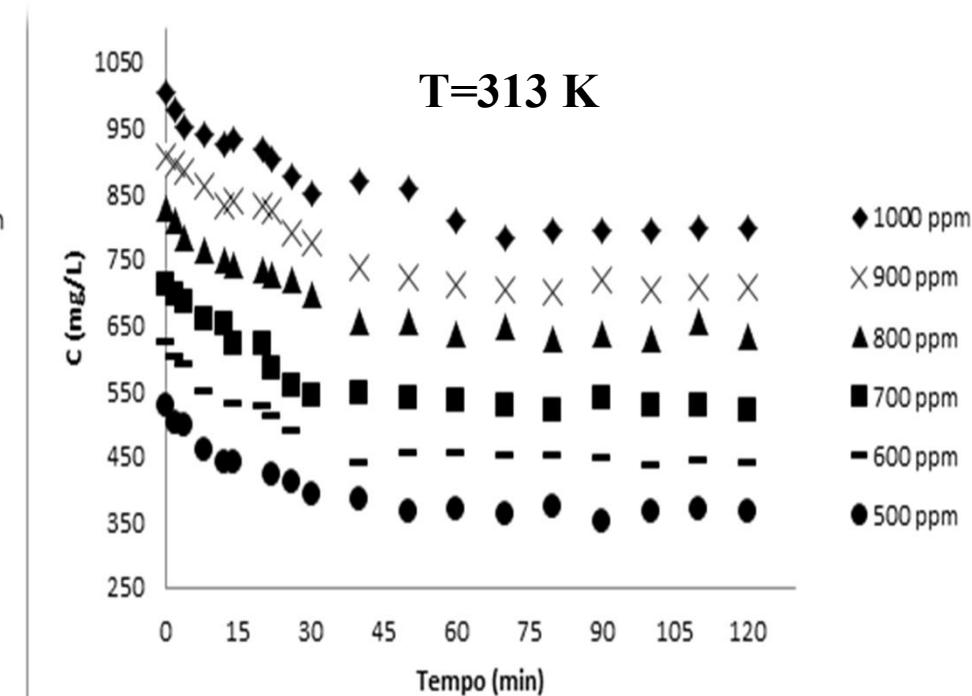
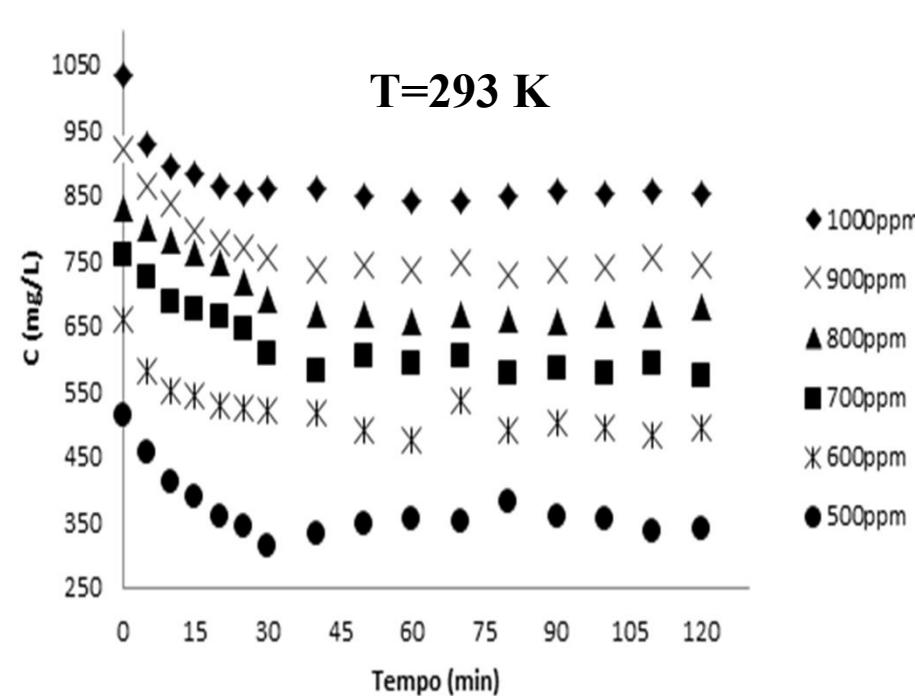
Monitoramento da concentração com  
NIR – Near Infrared Spectroscopy

# ADSORÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO EM SISTEMAS PRESSURIZADOS

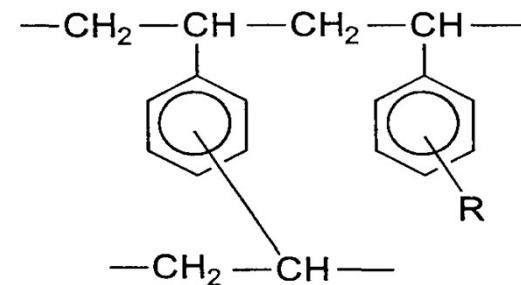
## Calibração da Concentração com NIR



# CURVAS DA CINÉTICA DE ADSORÇÃO DO $\beta$ -CAROTENO A ALTA PRESSÃO

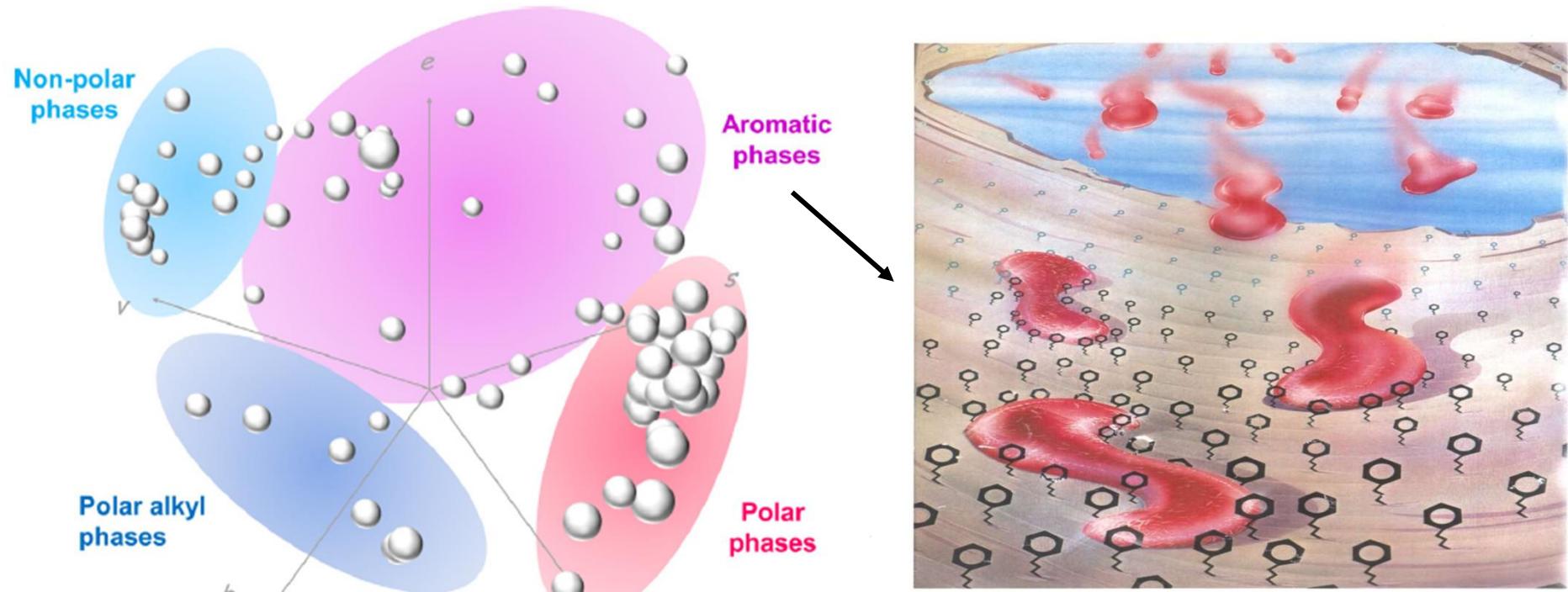


**Adsorvente:**



**Resina poliaromática Diaion HP-20.**

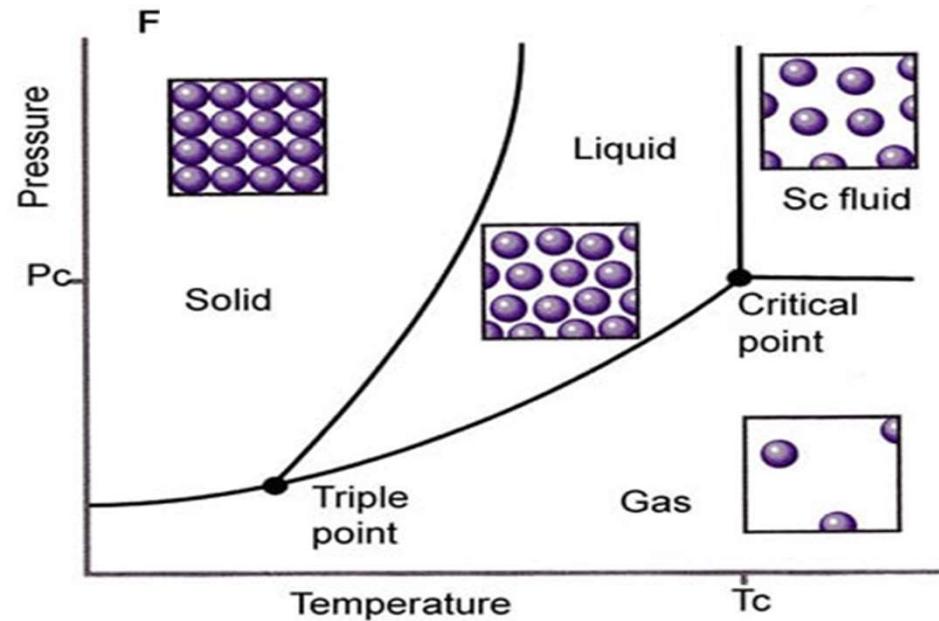
# CLASSIFICAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS UTILIZADAS EM COLUNAS DE SFC



Interação Hidrofóbica

**São mostradas diferentes áreas de seletividade com as fases menos polares à esquerda e com as fases mais polares no lado direito da figura.**

# FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SF): CONVENIENTES PARA A SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS TERMICAMENTE INSTÁVEIS



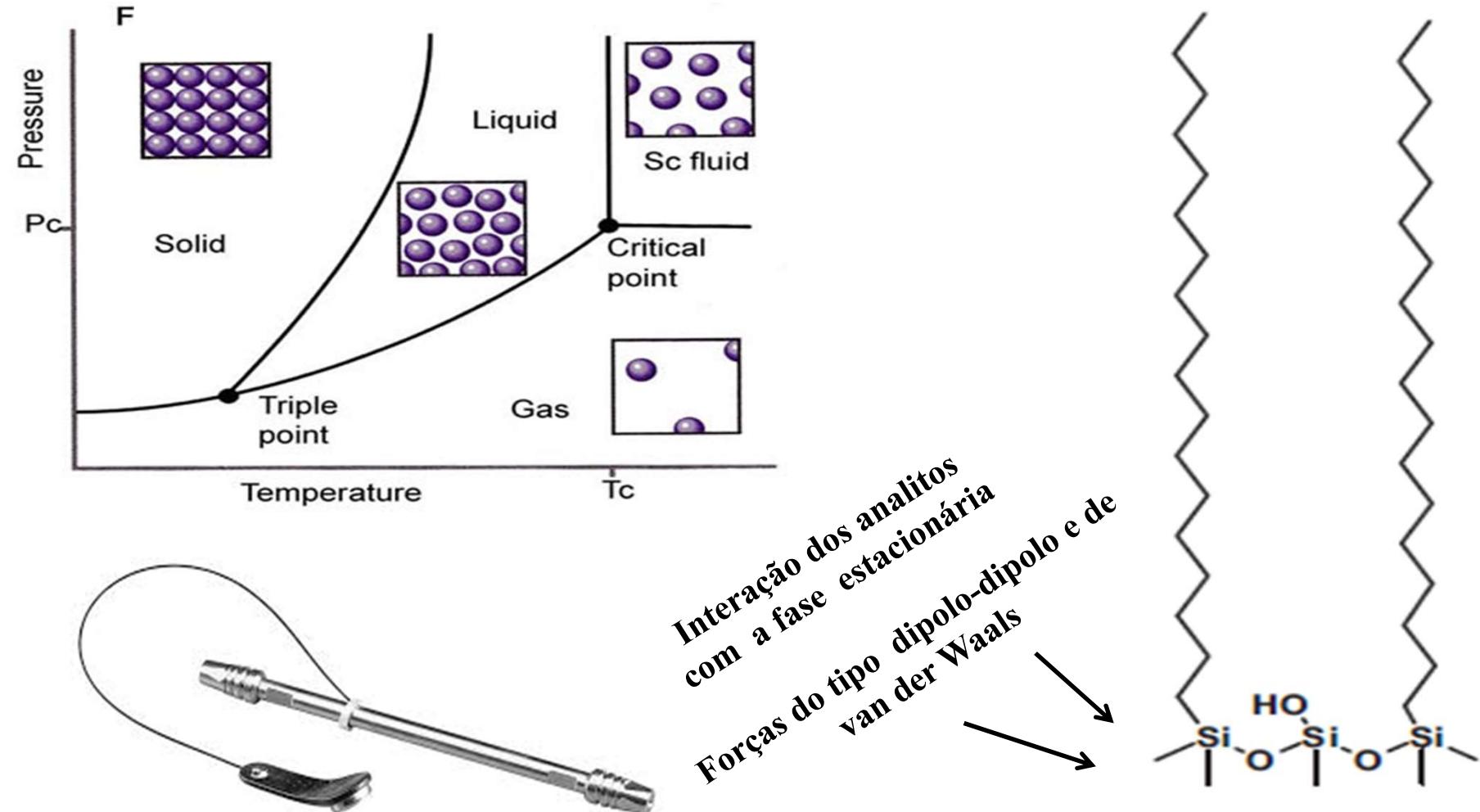
Coluna - HSS C<sub>18</sub> SB (3,0 x 100 mm, 1,8  $\mu$ m).



Supercrítico utilizado como fase móvel em Supercritical Fluid Cromatography (SFC)

- É amigável com o ambiente, não-toxico e não inflamável, bom preço, possui boa miscibilidade com a maior parte de solventes orgânicos polares e não-polares e facilmente disponível.
- Os experimentos são muito frequentemente realizados com uma mistura de CO<sub>2</sub> e um modificador orgânico de modo a aumentar a solubilidade de compostos polares.

# FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SF): CONVENIENTES PARA A SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS TERMICAMENTE INSTÁVEIS

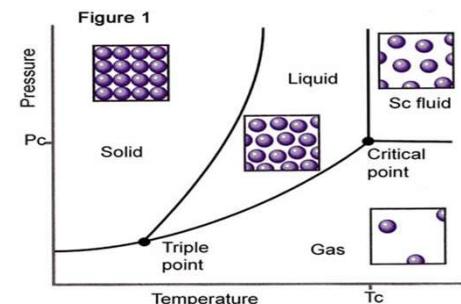


Coluna - HSS C<sub>18</sub> SB (3,0 x 100 mm, 1,8  $\mu$ m).

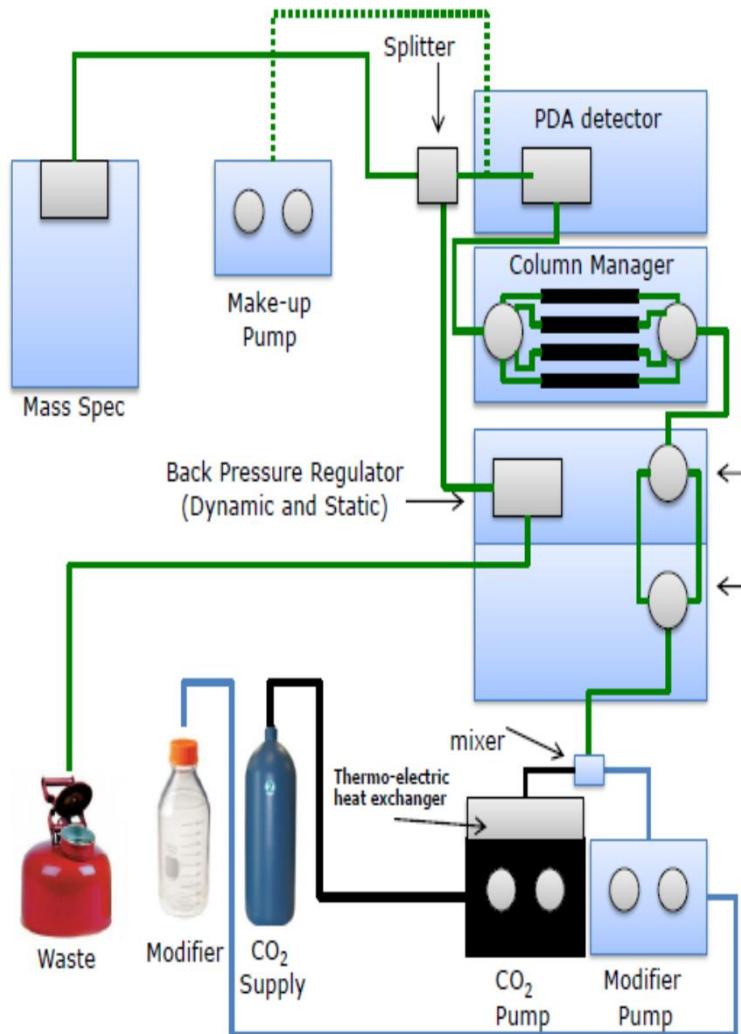
## FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SF): CONVENIENTES PARA A SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS TERMICAMENTE INSTÁVEIS

Recentemente há grande interesse em SFC devido à introdução de uma nova instrumentação na qual o sistema de controle da pressão foi altamente melhorado, provendo assim uma repetibilidade superior dos resultados.

Junta-se a esse fato a possibilidade de uso de partículas com tamanhos inferiores a 2 $\mu$ m na fase estacionária dando origem a uma nova geração de SFC denominada de **Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography (UHPSFC)**.



# VANTAGENS DA UHPSFC



Equipamento UHPSFC

## Propriedades críticas do CO<sub>2</sub> próximas da temperatura ambiente

Menores viscosidades da fase móvel resultando em quedas de pressão menores nas colunas

Redução do tempo De análise em comparação ao HPLC

Redução do consumo de solvente

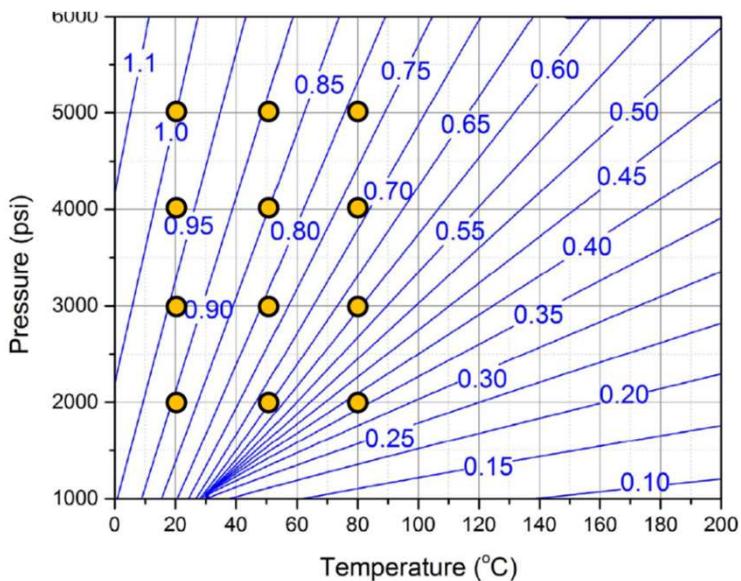
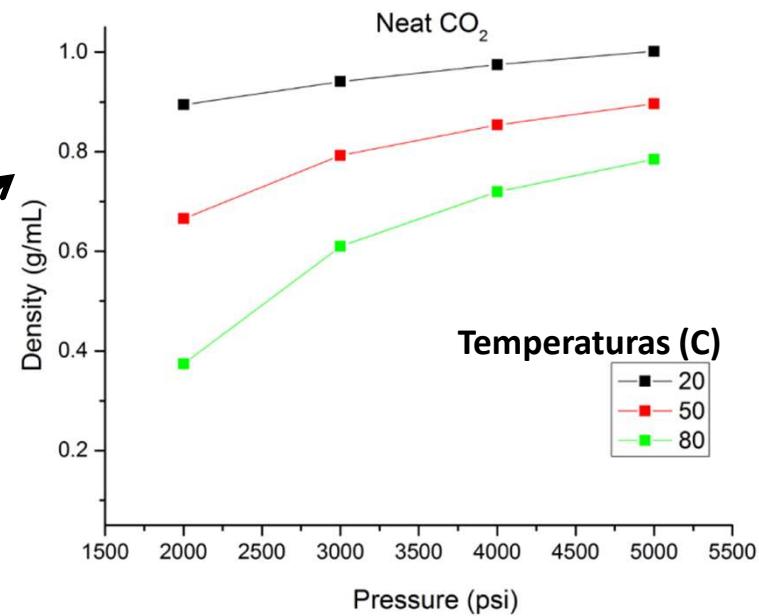
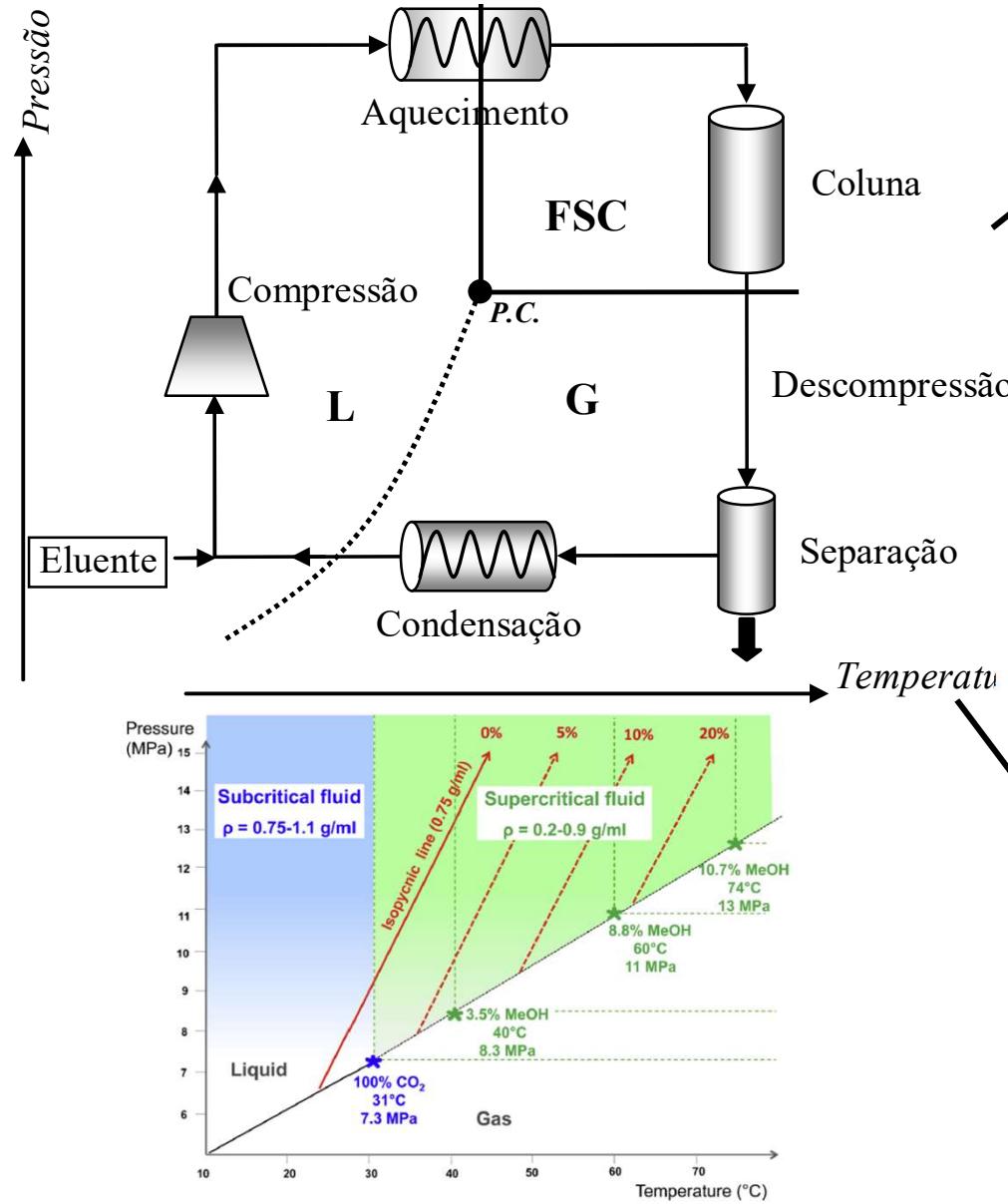
Maiores taxas de transferência de massa Resultando em maiores eficiências do que HPLC

Maior poder de solvatação para compostos não polares

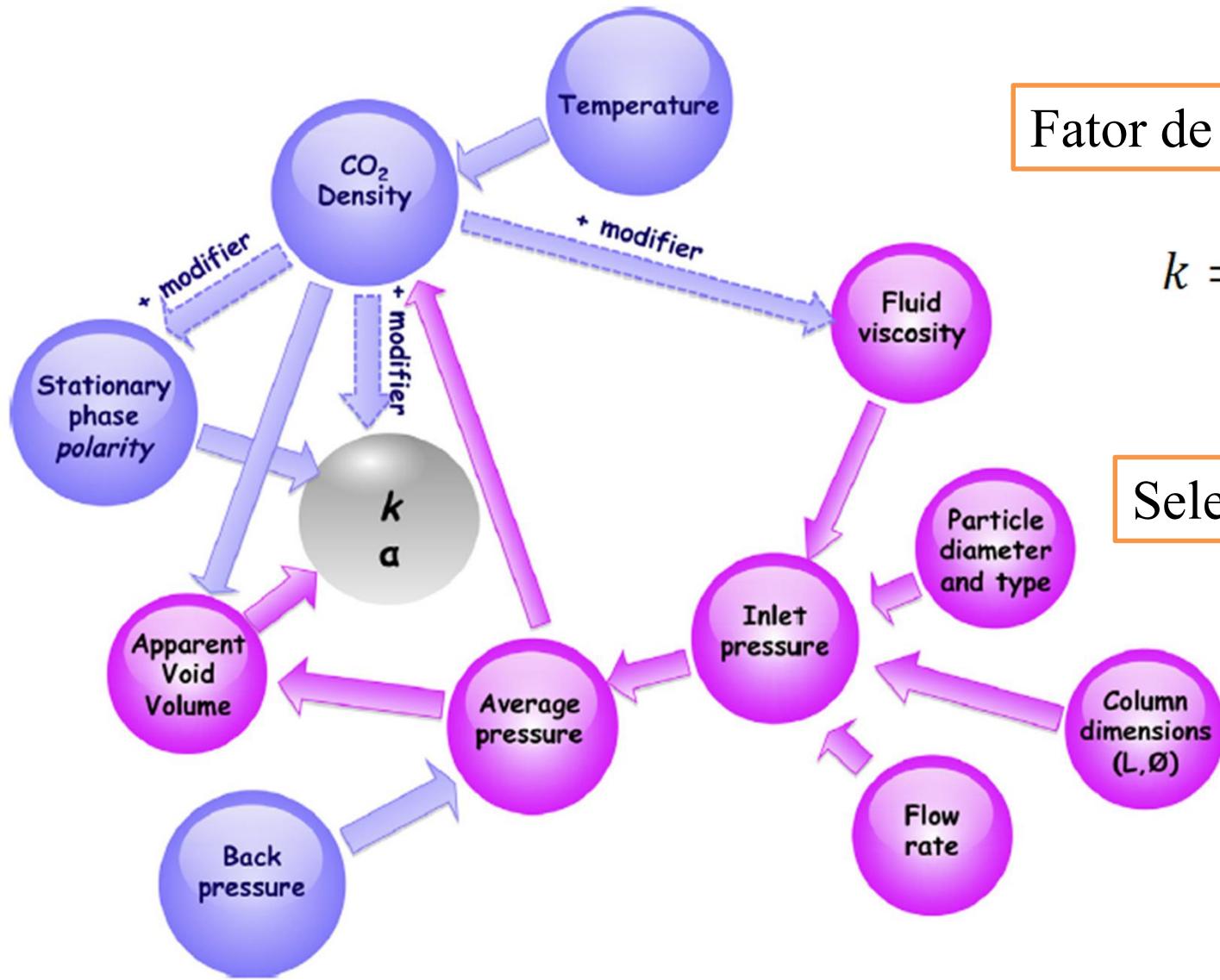
Versatilidade nas condições operacionais

A adição de co-solventes orgânicos melhora a solubilidade de compostos polares

# CARACTERÍSTICAS DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS



# MULTIPLICIDADE DE EFEITOS QUE AFETAM A RETENÇÃO E OS FATORES DE SEPARAÇÃO RELACIONADOS AOS DIVERSOS PARÂMETROS OPERACIONAIS



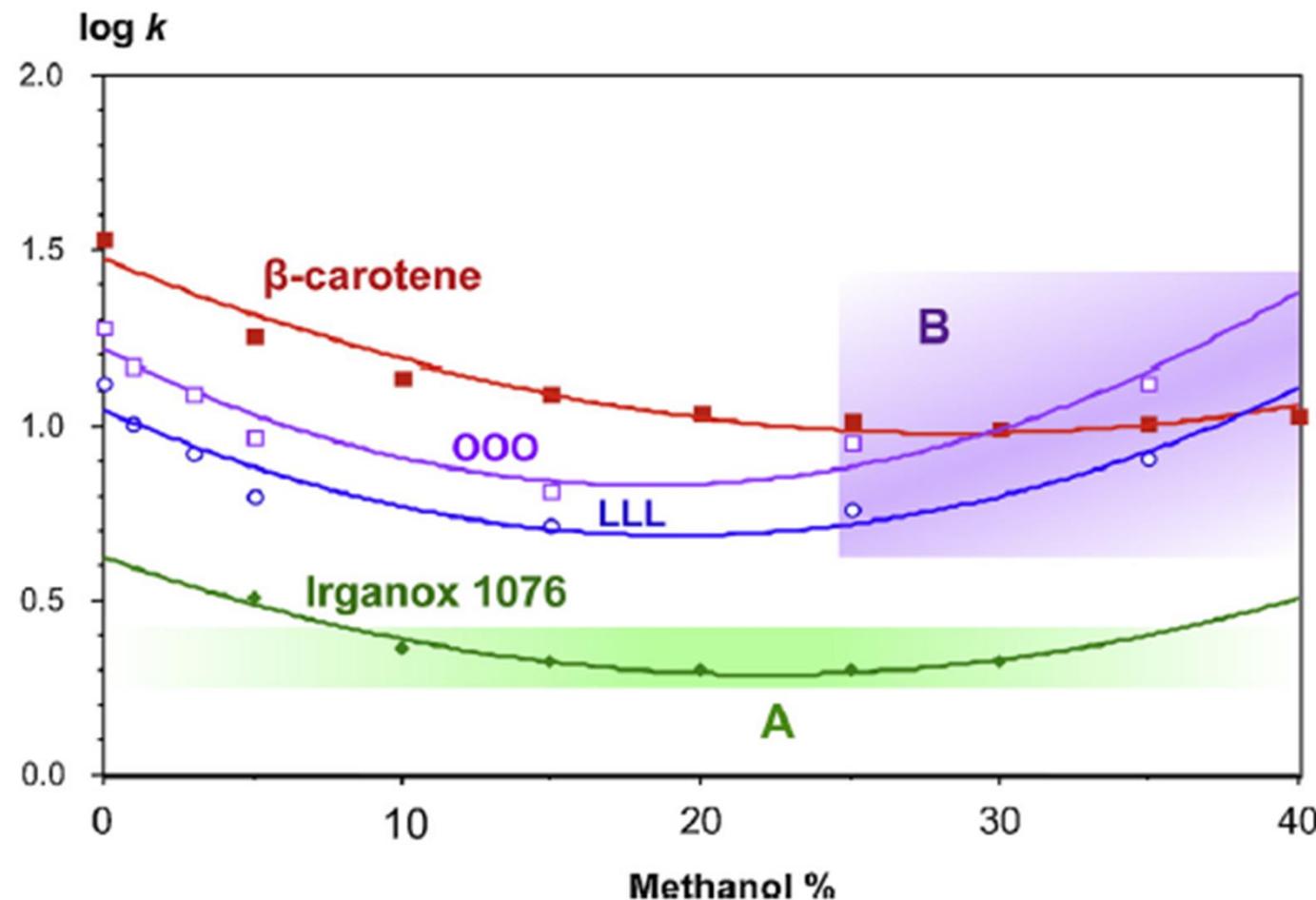
## Fator de Retenção

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

## Seletividade

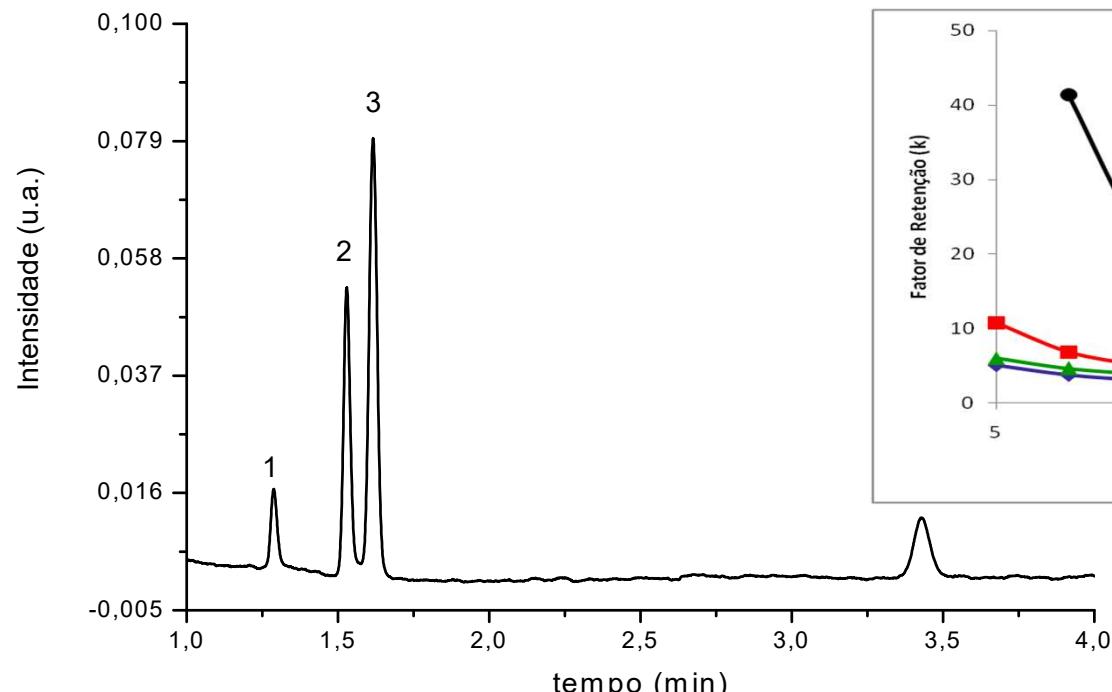
$$\alpha_{i,j} = \frac{k_i}{k_j}$$

## VARIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO EM FUNÇÃO DA PROPORÇÃO DE METANOL EM OCTADECIL SÍLICA

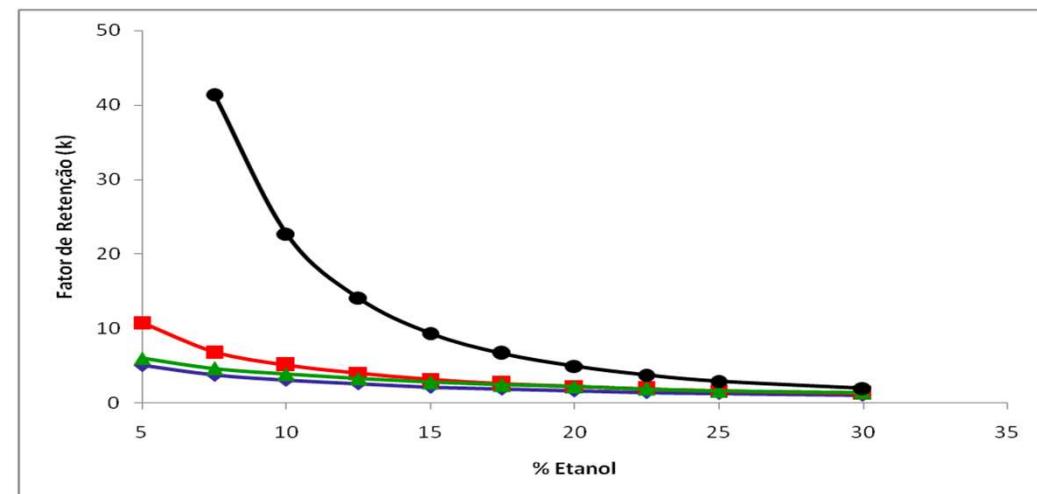


A área verde indica pequenas variações no fator de retenção enquanto a área púrpura indica a possibilidade de mudanças na ordem da eluição

# SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA POR UHPSFC Analítica ( CO<sub>2</sub> = Etanol)



Cromatograma da mistura (1) licopeno, (2) co-enzima Q10, (3) beta-caroteno and (4) luteina para a composição da fase móvel de CO<sub>2</sub>/etanol (75/25 v/v).



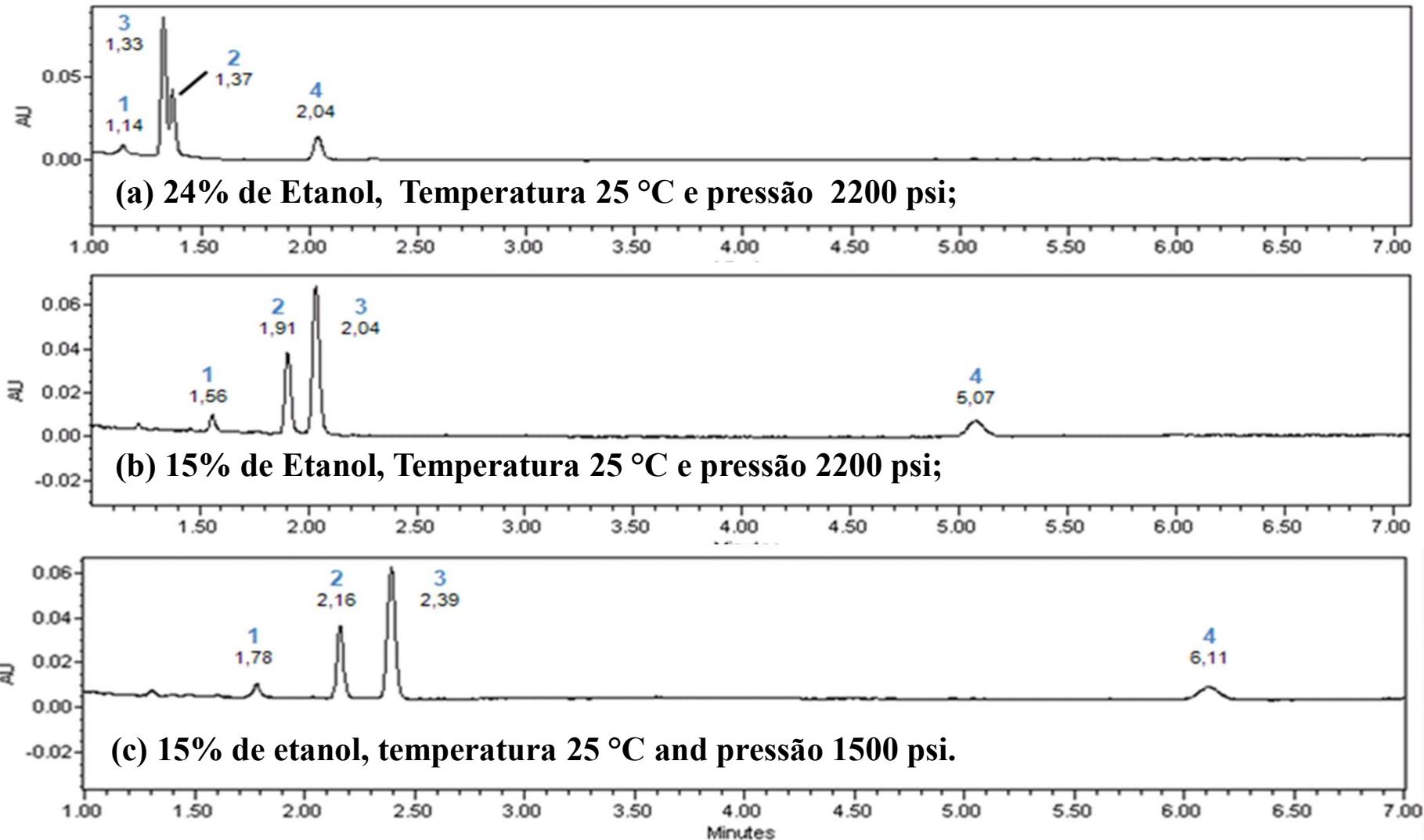
Variação do fator de retenção para (●) licopeno, (▲) beta-caroteno, (■) co-enzima Q10 e (●) luteina como função da percentagem de etanol

Coluna - HSS C<sub>18</sub> SB (3,0 x 100 mm, 1,8 µm)

**Fatores de retenção(k) para os 4 compostos na faixa de 15 a 30% etanol como co-solvente.**

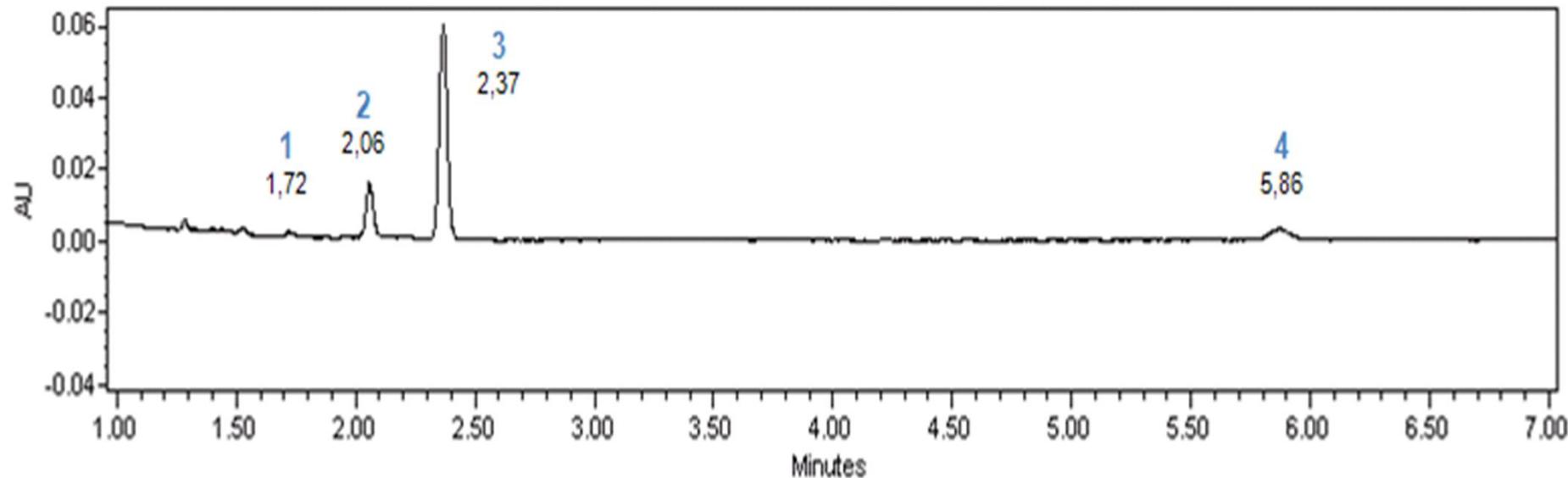
Componente	15%	20%	25%	30%
Licopeno	2,17	1,65	1,29	1,09
Coenzyma Q10	3,16	2,21	1,63	1,32
Beta-caroteno	2,77	2,21	1,63	1,43
Luteína	9,35	4,94	2,92	1,94

## CROMATOGRAMAS DE SEPARAÇÃO EM DIVERSAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS



1. Licopeno, 2.  $\beta$ -caroteno, 3. Coenzima Q10, 4. Luteína

## CONDIÇÕES OPERACIONAIS SELECIONADAS PARA EXPERIMENTOS POSTERIORES

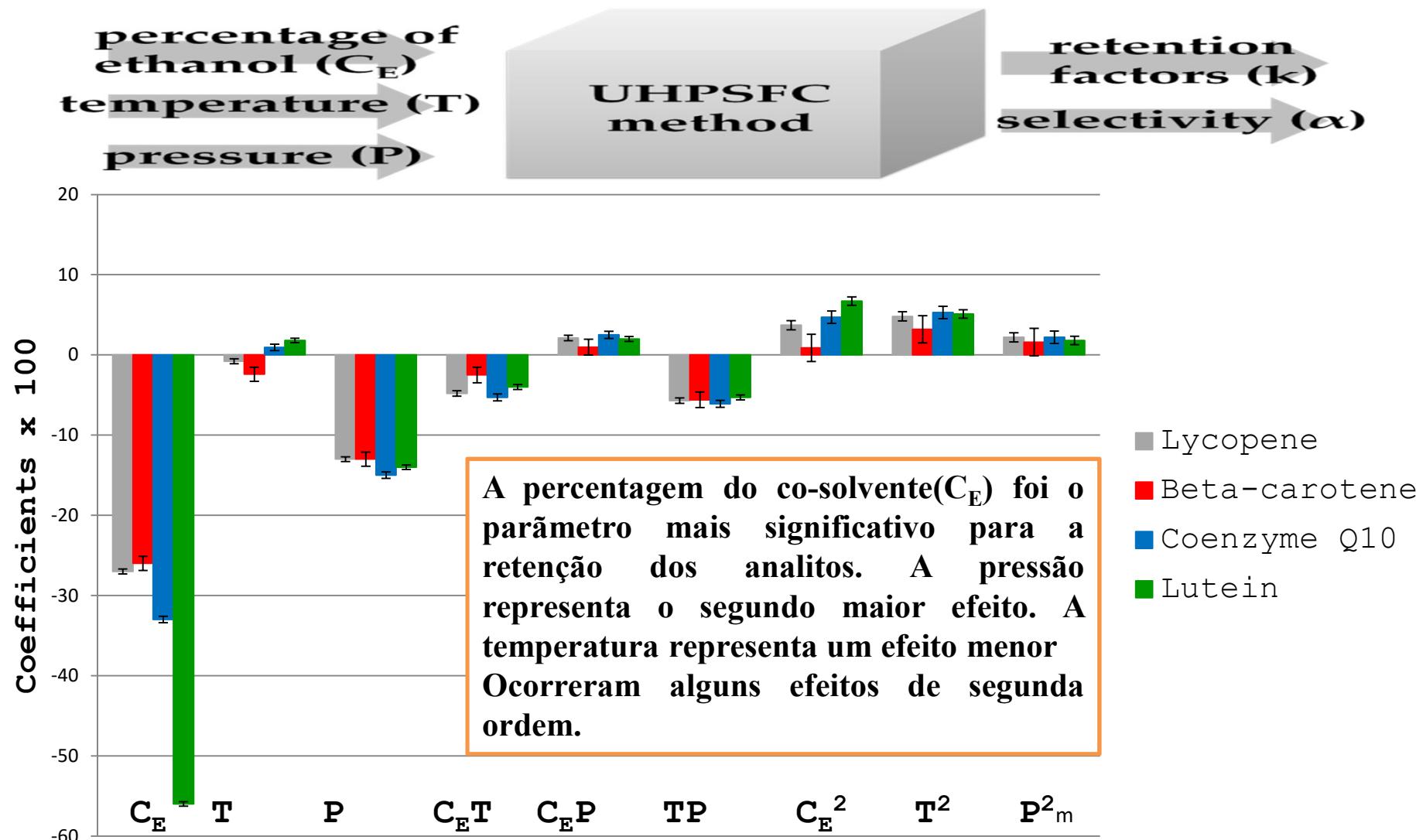


Cromatograma da separação: 1. Licopeno, 2.  $\beta$ -caroteno, 3. Co-enzima Q10, 4. Luteina.

Condições experimentais: 15.5 % de etanol, temperatura 40 °C e pressão 1500 psi.

Condições operacionais selecionadas para experimentos posteriores : 15.5% de etanol a 40 °C e 1500 psi, as quais estão localizadas dentro do domínio experimental e atendendo a ambos os critérios dos fatores de separação e de retenção.

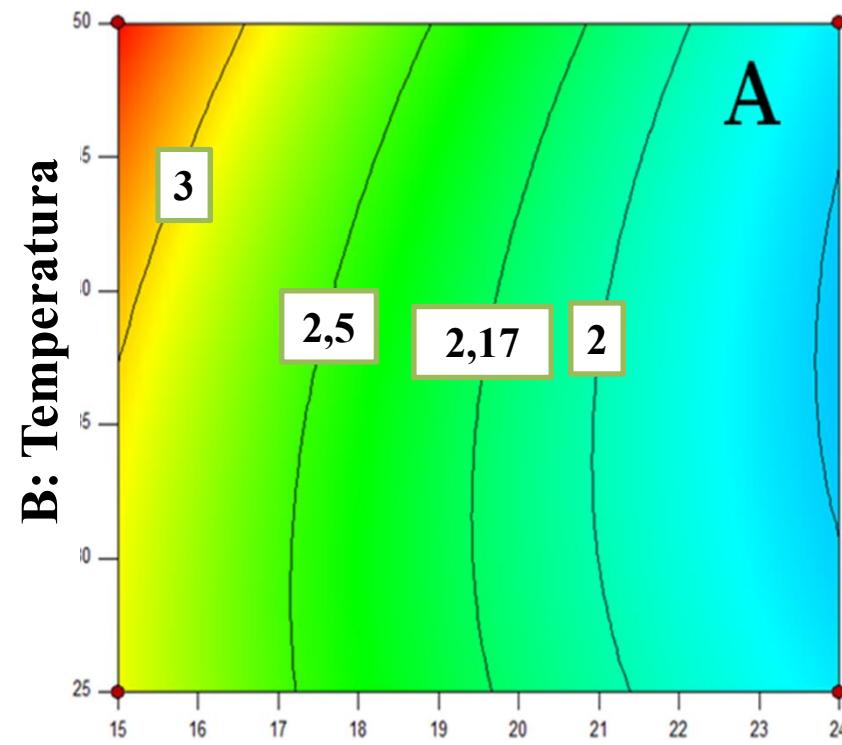
# PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: EFEITO DOS PARAMETROS OPERACIONAIS



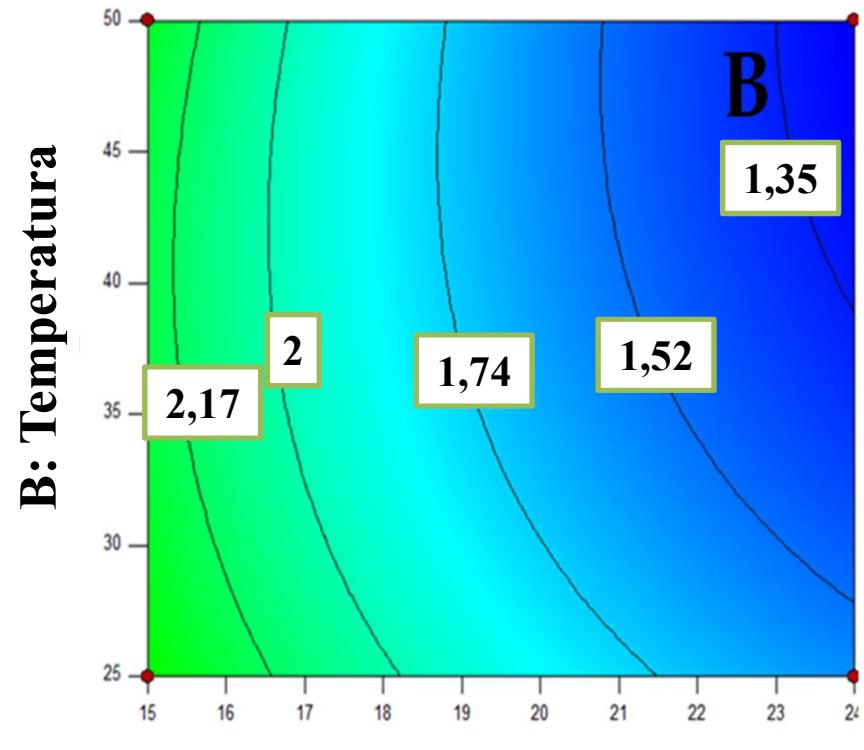
Os coeficientes do modelo se ajustam aos fatores de retenção do licopeno, beta-caroteno, co-enzima Q10 e luteína. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança dos coeficientes.

# PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: EFEITO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS

Os mapas de contorno do fator de retenção do licopeno é mostrado em função da temperatura e da percentagem de etanol. Observa-se que valores menores da pressão favorecem acharmos  $k > 2$  para todos os compostos



A: Etanol



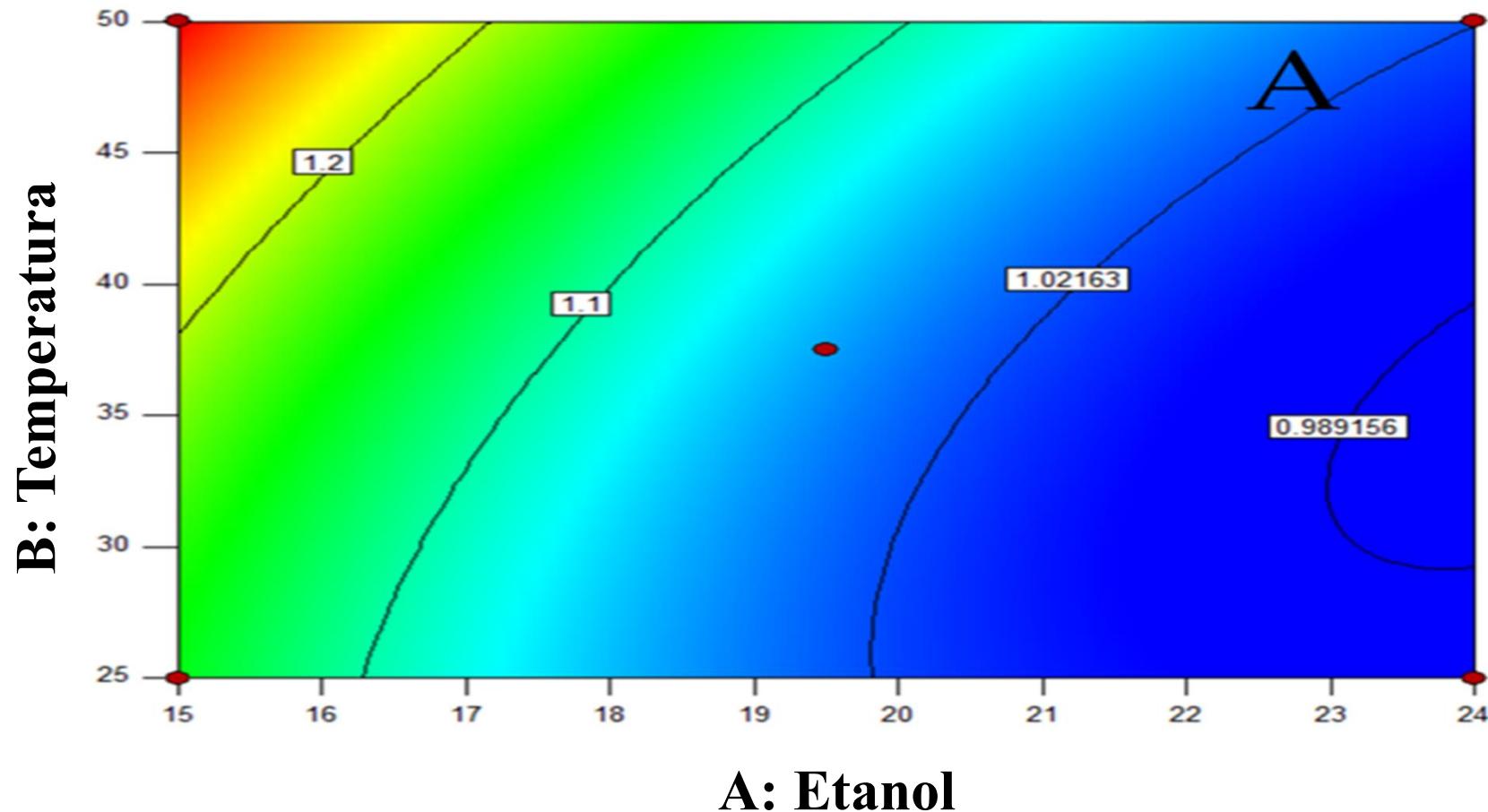
A: Etanol

Mapas de contorno para o fator de retenção (k) do licopeno para 1500 (A) and 2200 (B) psi.

Resolução multivariável de curvas com mí Alternating Least Squares (MCR-ALS) and Independent Component Analysis (ICA)

## PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: EFEITO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS

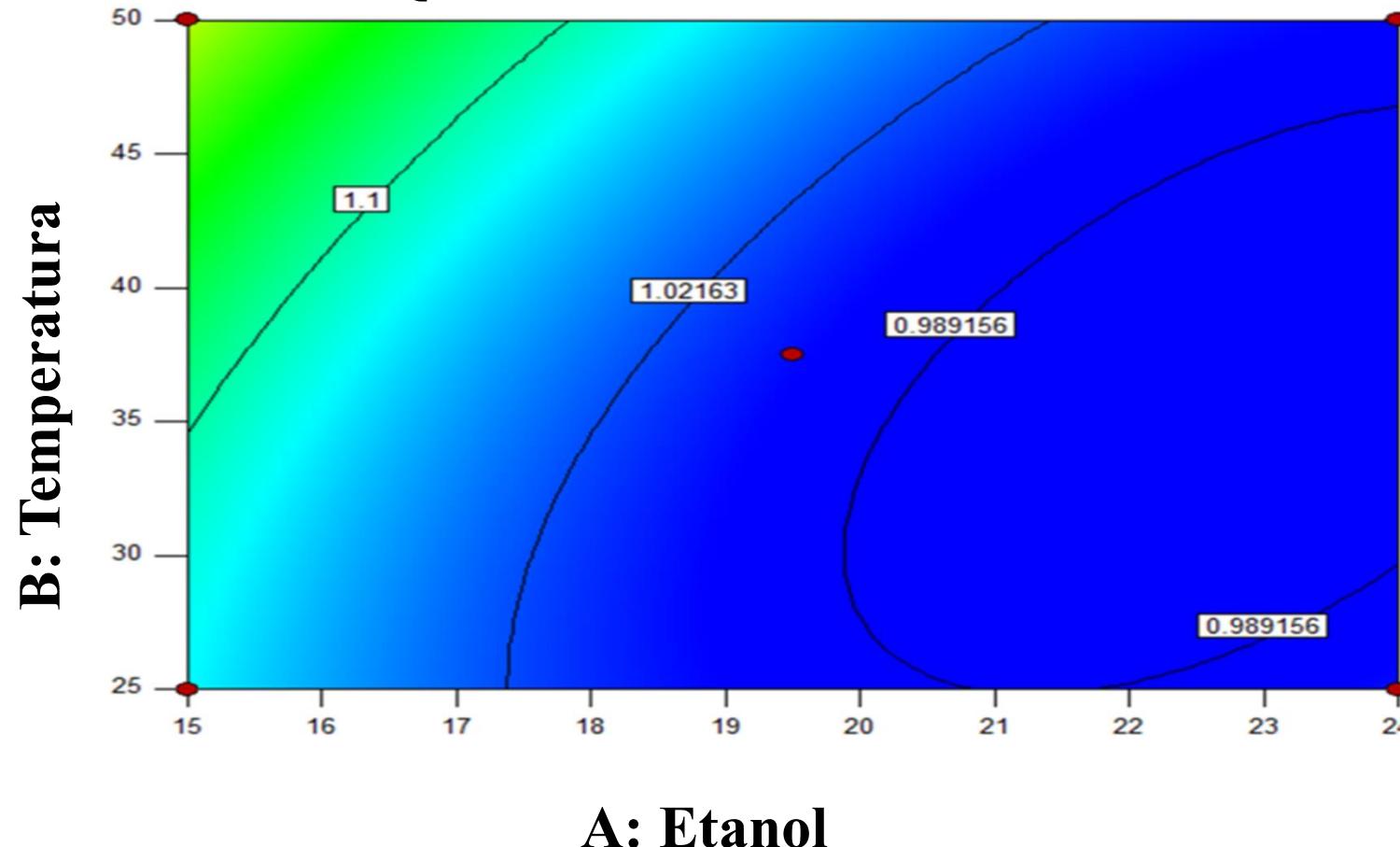
Seletividade ( $\alpha$ ): A separação dos compostos foi medida pelo fator de separação  $\alpha$  o qual é desejável que atenda a condição maior que 1.5. A separação mais difícil foi a do  $\beta$ -caroteno e da co-enzima Q10.



Mapas de contorno para os fatores de separação de beta-caroteno e Co-enzima Q10 como função da temperatura e da percentagem de etanol a 1500 (A) and 2200 (B) psi.

## PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: EFEITO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS

**Seletividade ( $\alpha$ ):** A separação dos compostos foi medida pelo fator de separação  $\alpha$  o qual é desejável que atenda a condição maior que 1.5. A separação mais difícil foi a do  $\beta$ -caroteno e da co-enzima Q10.



Mapas de contorno para os fatores de separação de beta-caroteno e Co-enzima Q10 como função da temperatura e da percentagem de etanol a 1500 (A) and 2200 (B) psi.

## PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: EFEITO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS

O enfoque multi-variável baseado no planejamento dos experimentos permitiu quantificar a influência das variáveis experimentais na retenção e separação de carotenóides pelo desenvolvimento do método UHPSFC e identificar uma região robusta de trabalho que poderá ser empregada em experimentos posteriores.

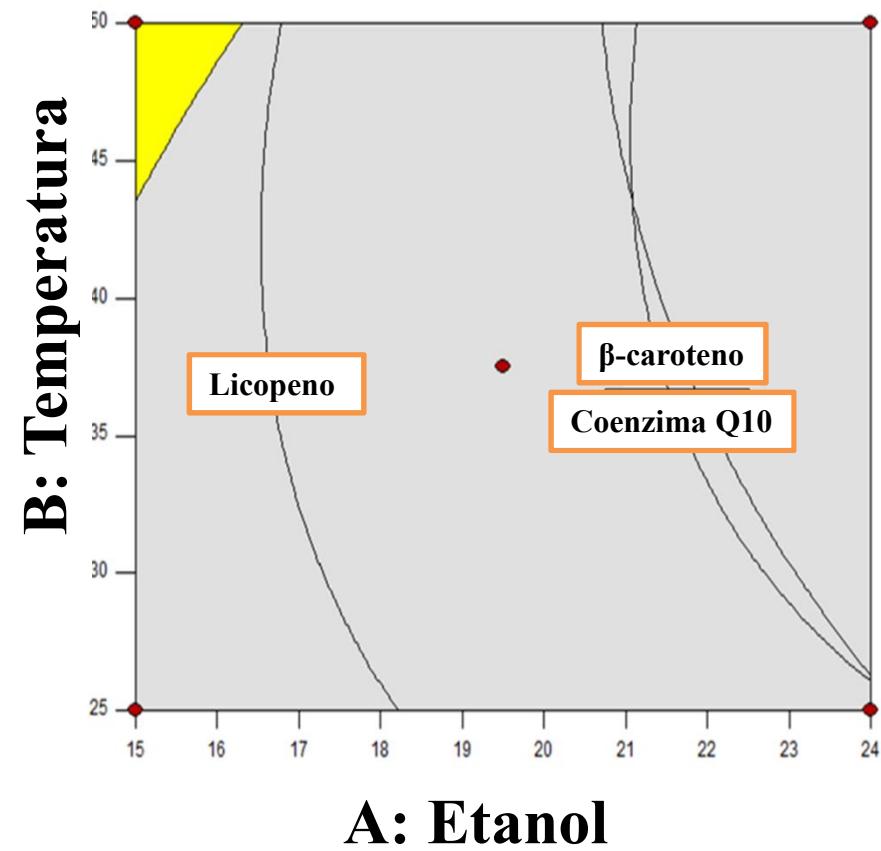
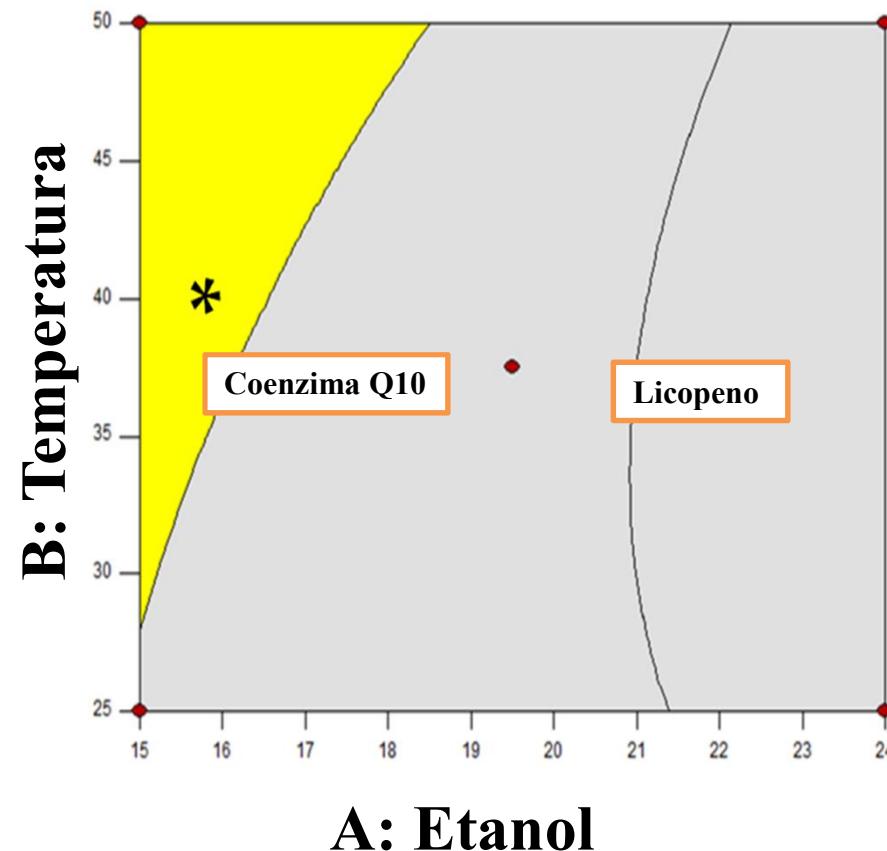
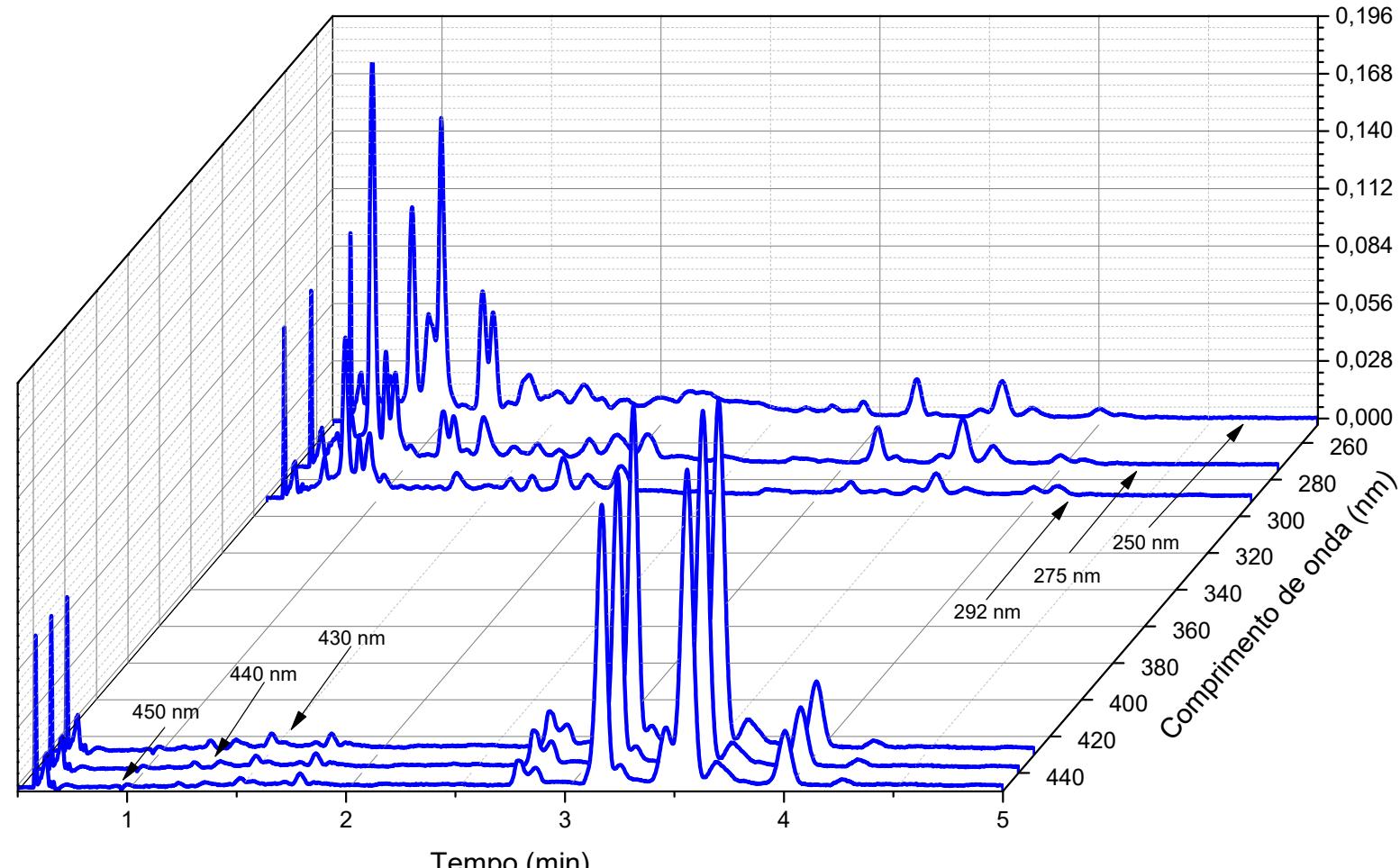


Gráfico de superposição sendo destacado em amarelo a região que preenche os requisitos de retenção e seletividade. (A) mostra os resultados a 1500 psi e (B) a 2200 psi. A condição selecionada para trabalhos posteriores é marcada com (\*).

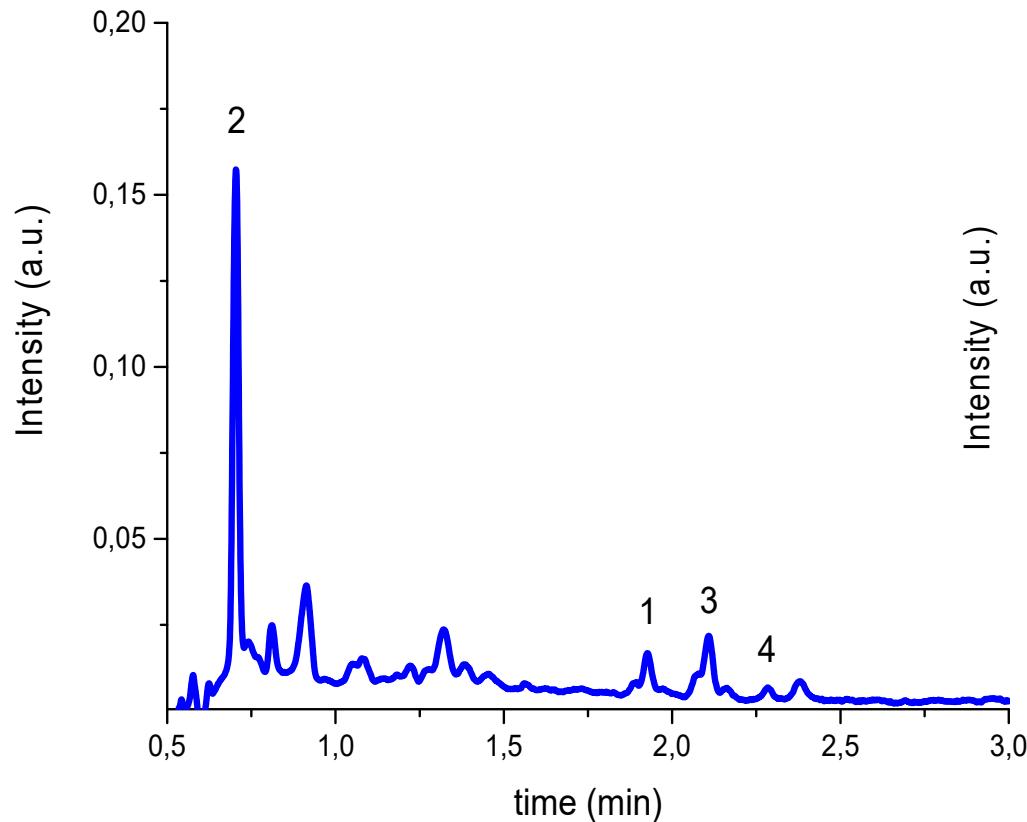
# CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DE COMPONENTES DO EXTRATO BRUTO DE ÓLEO DE DENDÊ



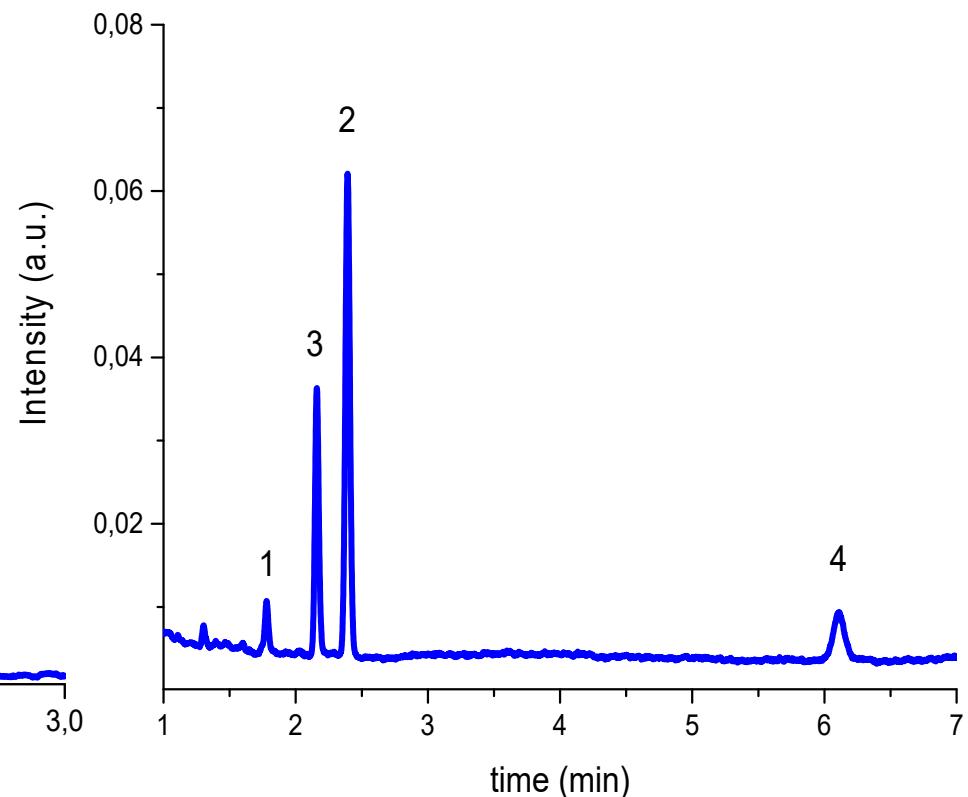
Cromatogramas de amostras de óleo de dendê ( $400 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) obtidas em vários comprimentos de onda

Valores selecionados : 250, 275 and 430 nm.

## ATRIBUIÇÃO DOS PICOS DOS COMPONENTES NA SEPARAÇÃO DA MISTURA

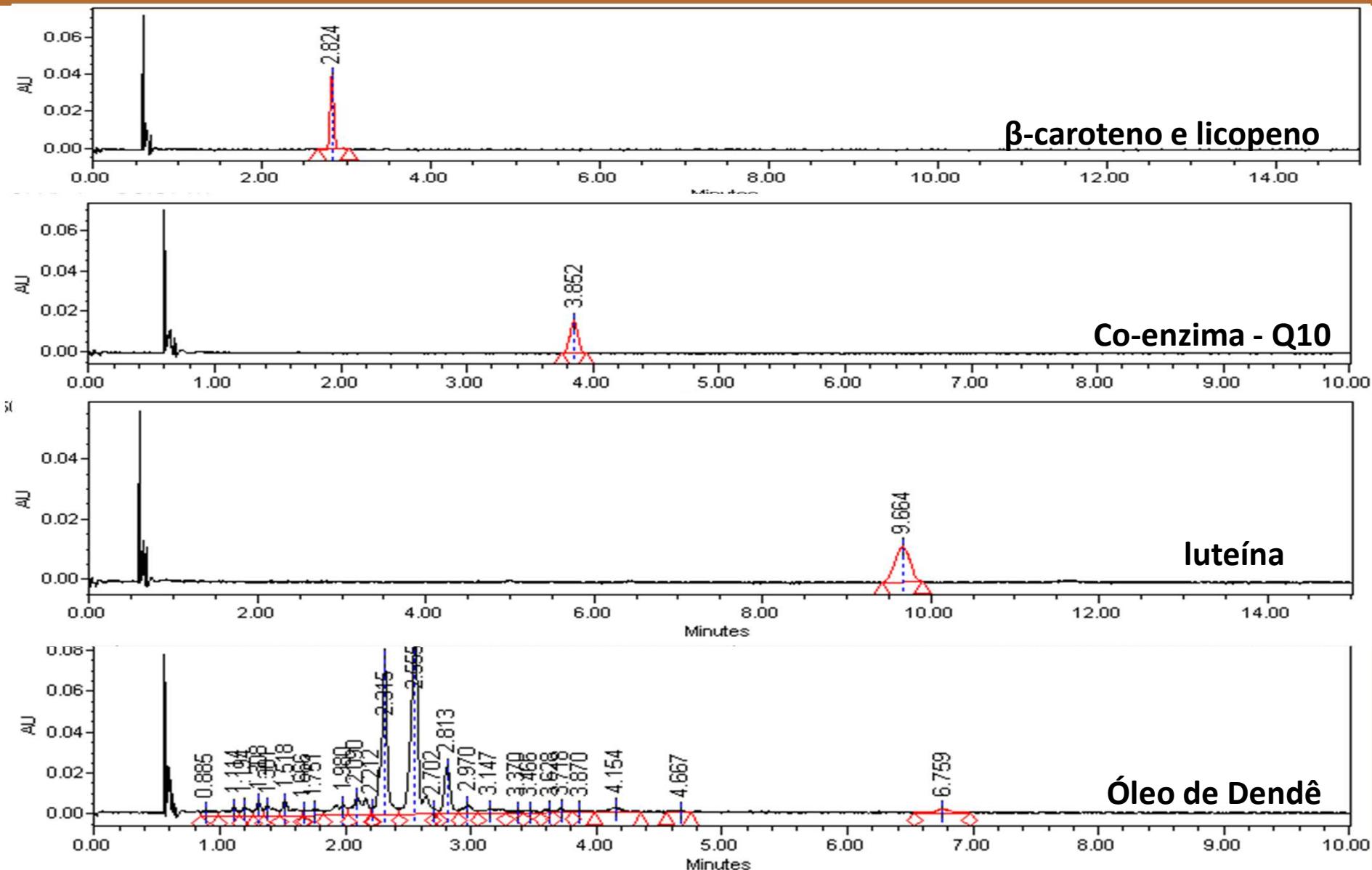


**Cromatograma do óleo de dendê (1) licopeno, (2) co-enzima Q10, (3) betacaroteno e (4) luteina. A concentração de óleo na amostra é 400 mg/mL.**

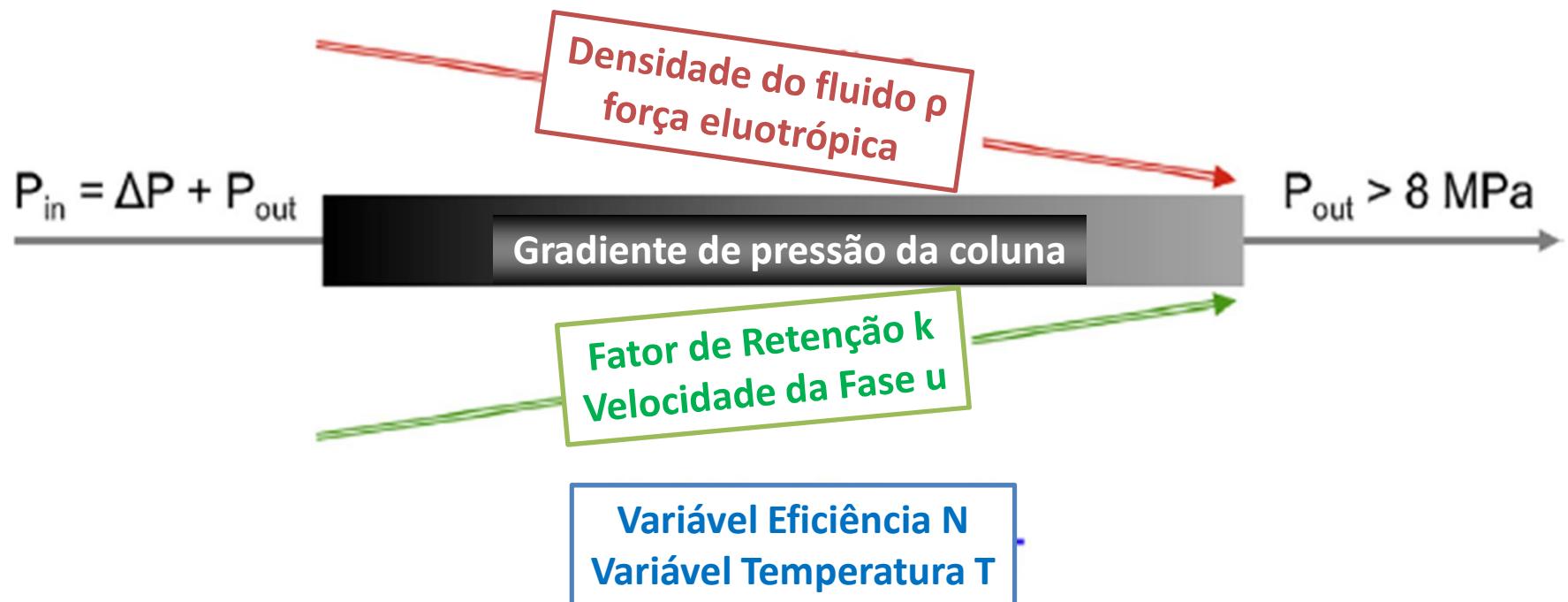


**Cromatograma da mistura sintética(1) licopeno, (2) co-enzima Q10, (3) betacaroteno e(4)luteina. A concentração total na amostra é 0,2 mg/mL.**

# IDENTIFICAÇÃO DE PICOS DOS COMPOSTOS INDIVIDUAIS NO CROMATOGRAMA DO ÓLEO DE DENDÊ



## EFEITO DO GRADIENTE DE PRESSÃO NA COLUNA



O gradiente de pressão na coluna modifica a massa específica do fluido e variações em outras propriedades relevantes para o fator de retenção como a viscosidade e condutividade térmica.

Variáveis importantes para a pressão interna em cada seção da coluna são a pressão na saída, a temperatura, a vazão, as dimensões da coluna, o tamanho das partículas e a proporção do co-solvente.

# QUEDA DE PRESSÃO EM COLUNAS E ISO-DENSIDADES

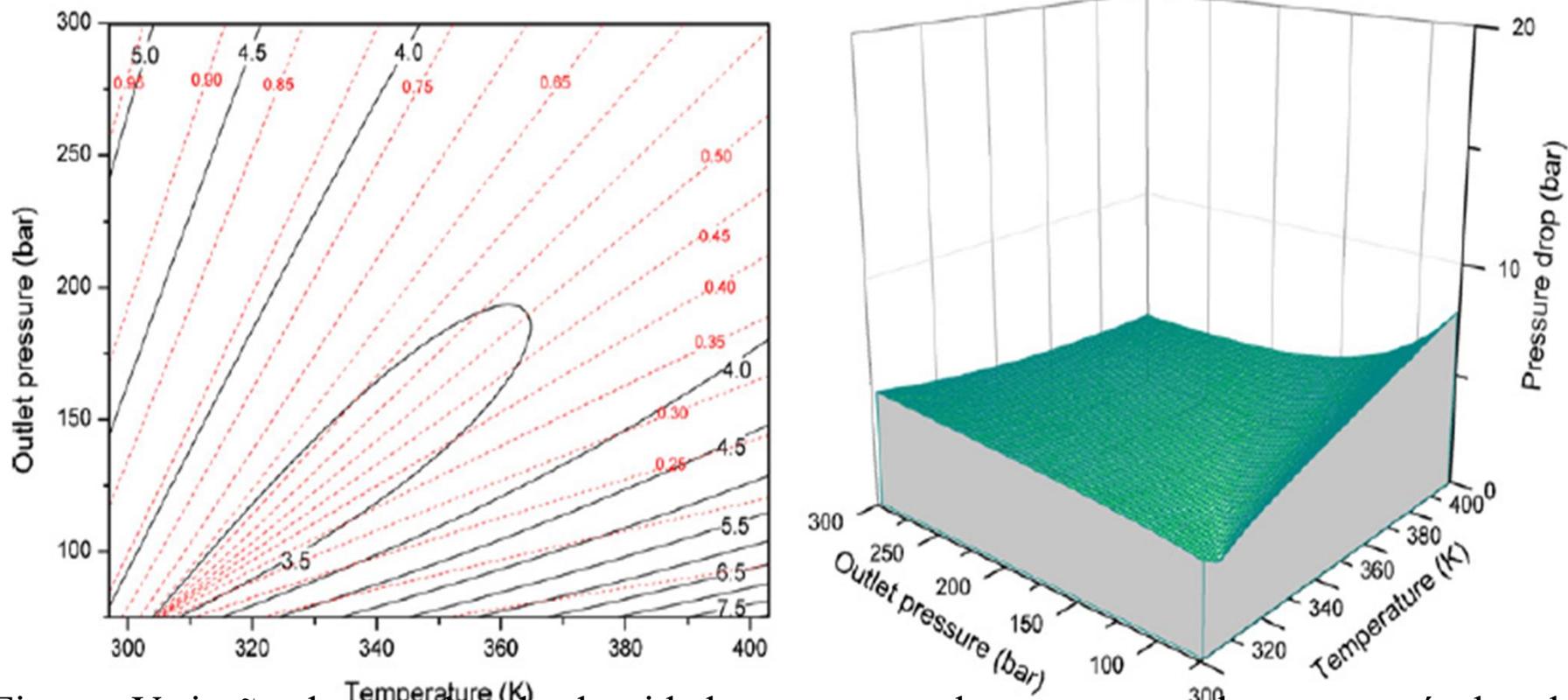


Figura: Variação das quedas de densidade em uma coluna empacotada com partículas de 10 micrometros, operada a uma taxa de fluxo mássico de 3g/min. A figura da esquerda mostra o diagrama de contorno (linhas sólidas, queda de densidade constante). A figura da direita mostra o diagrama 3D do mesmo dado. No diagrama de contorno, as linhas isocóricas de CO<sub>2</sub> (linhas tracejadas) estão sobrepostas para mostrar a relação entre densidade e quedas de densidade.

*Tarafder e Guiochon, J. Of Chromat. A, 2011, 2012 e 2015.*

# VARIAÇÕES DE DENSIDADES EM FUNÇÃO DA QUEDA DE PRESSÃO EM COLUNAS DE SFC

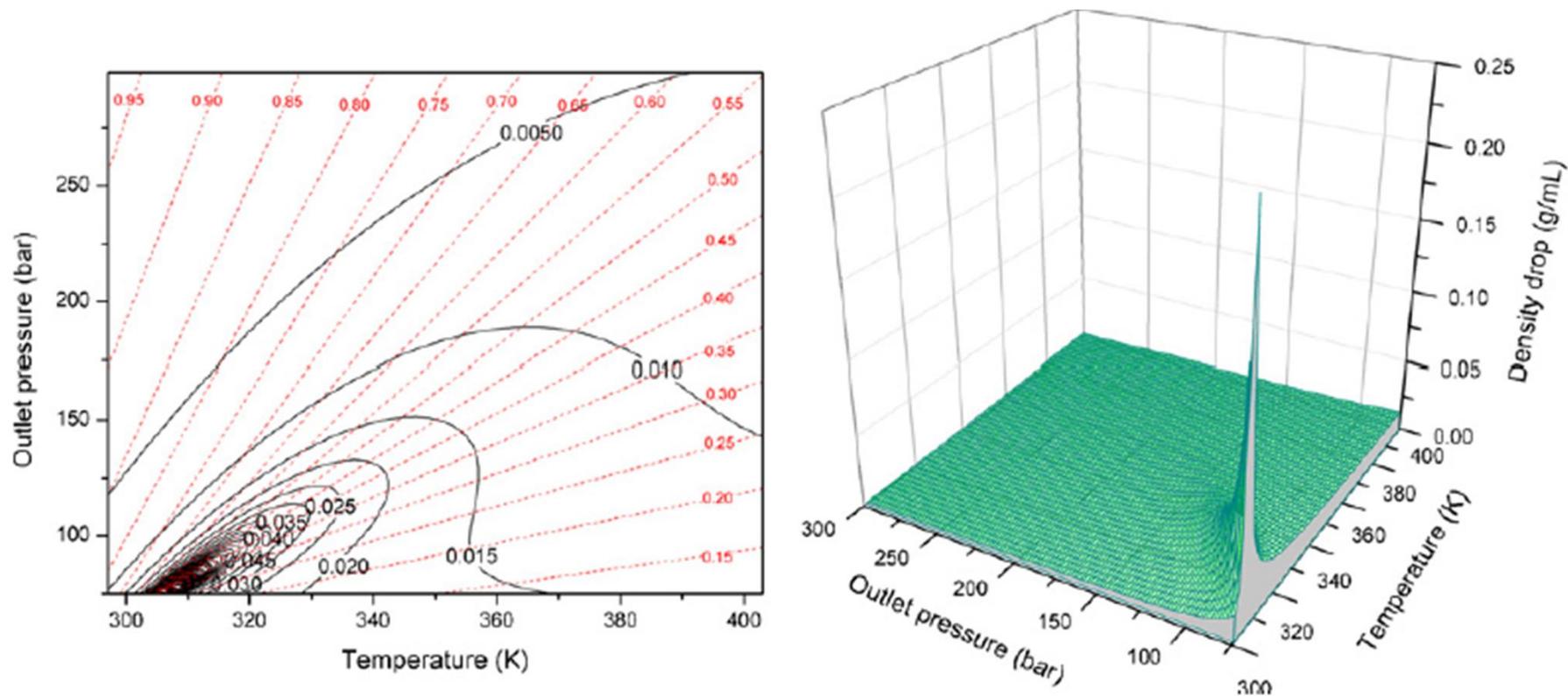


Figura: Variação das quedas de densidade em uma coluna empacotada com partículas de 10 micrometros, operada a uma taxa de fluxo mássico de 3g/min. A figura da esquerda mostra o diagrama de contorno (linhas sólidas, queda de densidade constante). A figura da direita mostra o diagrama 3D do mesmo dado. No diagrama de contorno, as linhas isocóricas de CO<sub>2</sub> (linhas tracejadas) estão sobrepostas para mostrar a relação entre densidade e quedas de densidade.

*Tarafder e Guiochon, J. Of Chromat. A, 2011, 2012 e 2015.*

## SIMULAÇÕES DO PERfil DE MASSA ESPECÍFICA NA COLUNA MOSTRANDO O EFEITO DA MODULAÇÃO DA PRESSÃO

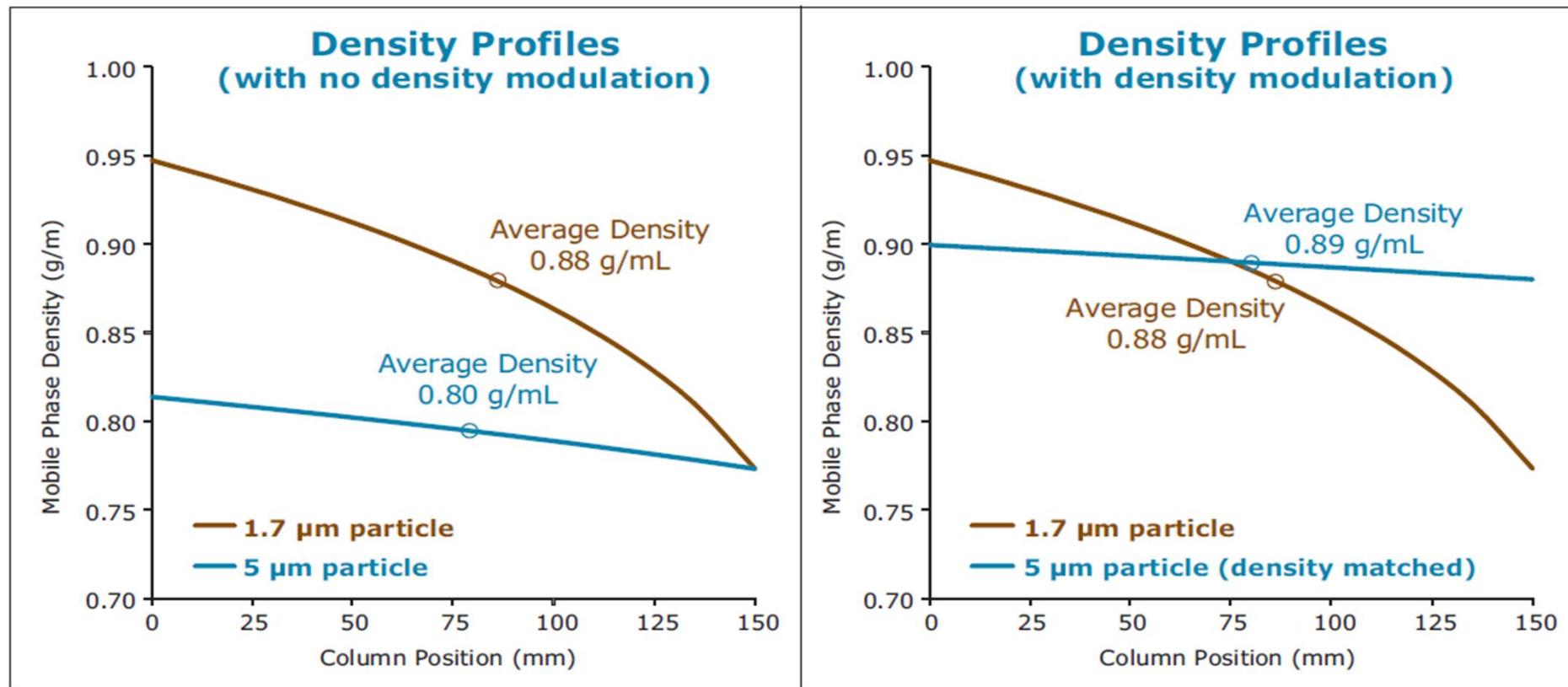
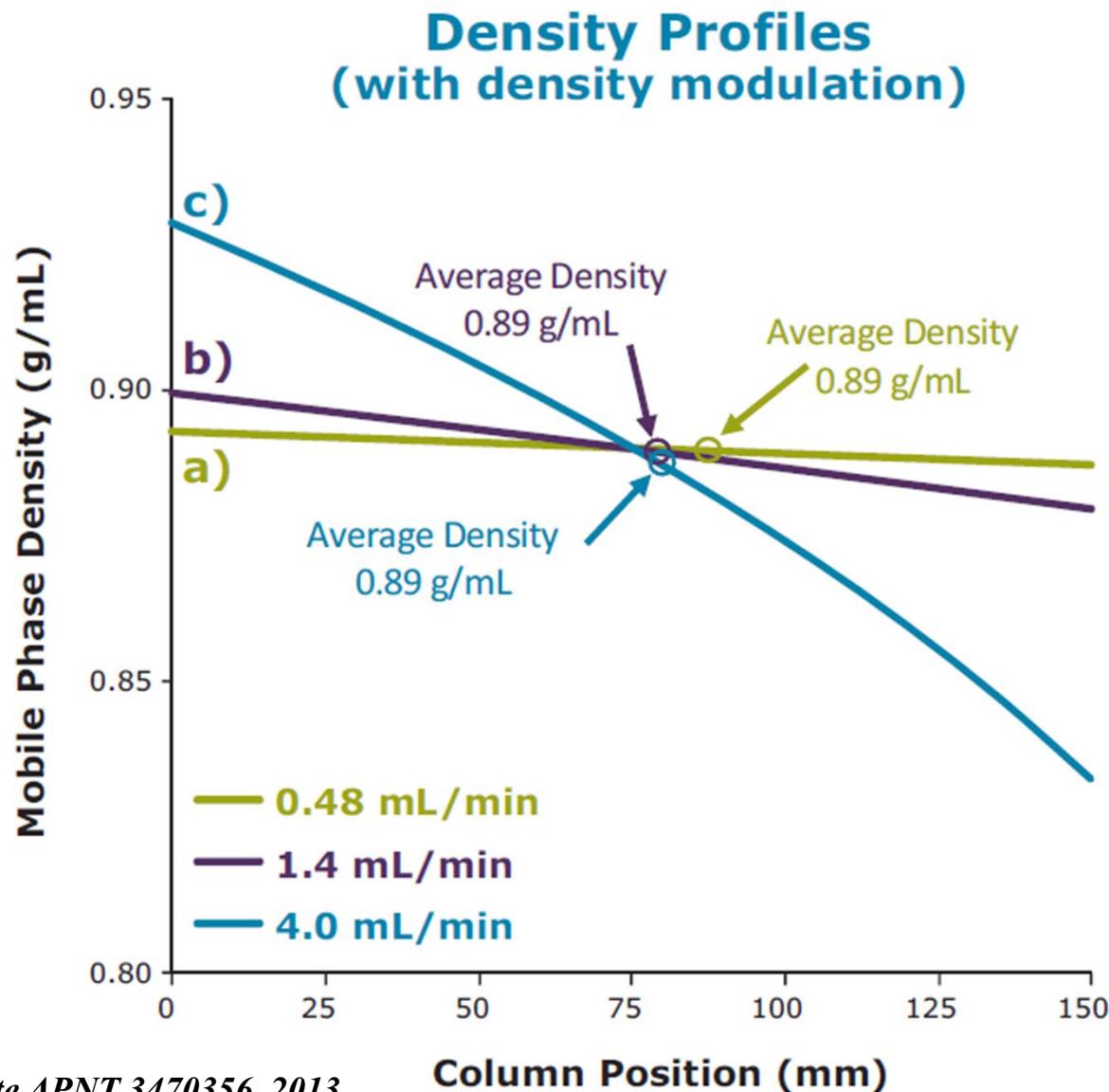


Figura: Simulações de densidade mostrando a queda de densidade da fase móvel ao longo de uma coluna de 150 mm. A figura à esquerda representa os cálculos para as separações mostradas na Figura 1 sem modulação de densidade. A figura à direita inclui os mesmos cálculos para uma partícula de 1,7 micrômetro, mas usa modulação de densidade para partícula de 5 micrometro a fim de encontrar aproximadamente a mesma densidade média para as duas separações.

Waters Application Note APNT 3470356, 2013

## SIMULAÇÕES DO PERfil DE MASSA ESPECÍFICA NA COLUNA MOSTRANDO O EFEITO DA MODULAÇÃO DA PRESSÃO



## ASPECTOS A SEREM CONSIDERADOS PARA UMA ESTRATÉGIA DE AMPLIAÇÃO DE ESCALA DO PROCESSO

### Estudo de Transferência de Escala

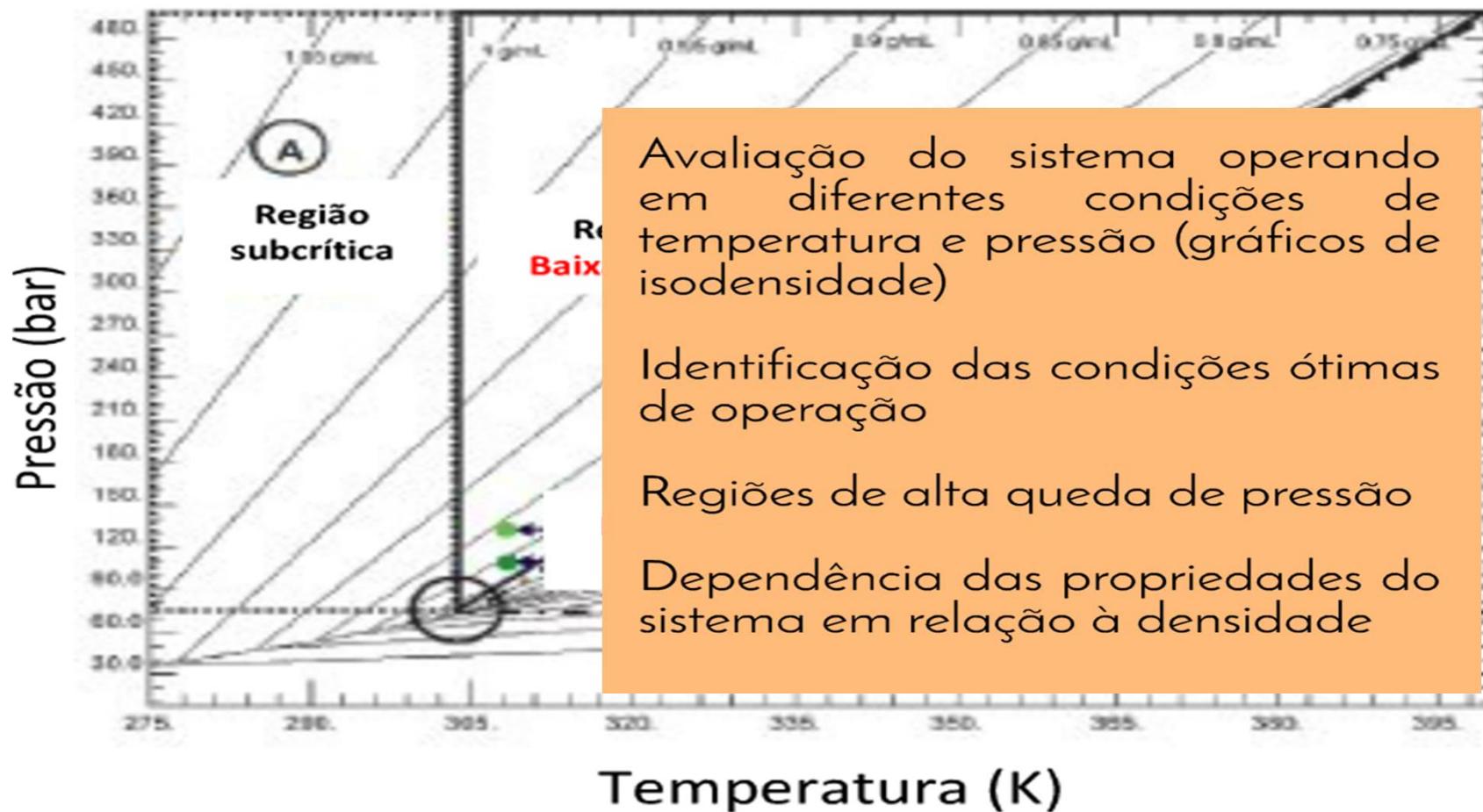


Diagrama de Isodensidade do CO<sub>2</sub> supercrítico

Luo e Wang (2013) Waters

# ASPECTOS TERMODINÂMICOS NA AMPLIAÇÃO DE ESCALA NA CROMATOGRAFIA COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFC) – BASEADO NOS ARTIGOS DO TARAFDER E GUIOCHON

## Densidade, Retenção e Temperatura

Perrut propôs expressão para a relação entre densidade, retenção e temperatura

$$\left( \frac{\partial \ln \rho k_i}{\partial P} \right)_T = \frac{V_{i,sol} - V_{i,ads}}{RT} - k$$

Onde  $k_i$  é o fator de retenção do componente  $i$ ,  $V_{i,sol}$  e  $V_{i,ads}$  são os volumes molares parciais na solução e adsorvido, respectivamente.  $k$  é a compressibilidade da fase móvel

A integração resulta em

$$\ln(k_i) = -(\lambda_i + 1) \ln(\rho) + \ln(f_i(T))$$

$\lambda$  é função da interação de cada componente da mistura com a fase estacionária

$$\ln(k_i) = -(\lambda_i + 1) \ln(\rho) + \ln(f_i(T))$$

A dependência dos fatores de retenção nos parâmetros de densidade e temperatura pode ser efetivamente usada para avaliar como os dados de retenção variam com as condições de operação. Como a pressão de entrada e a queda de pressão.

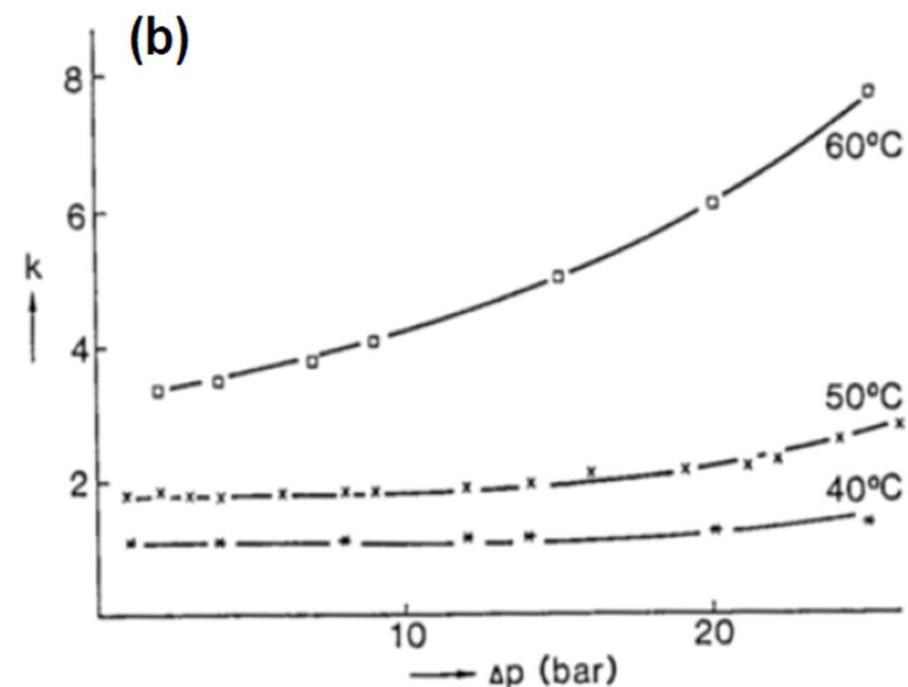
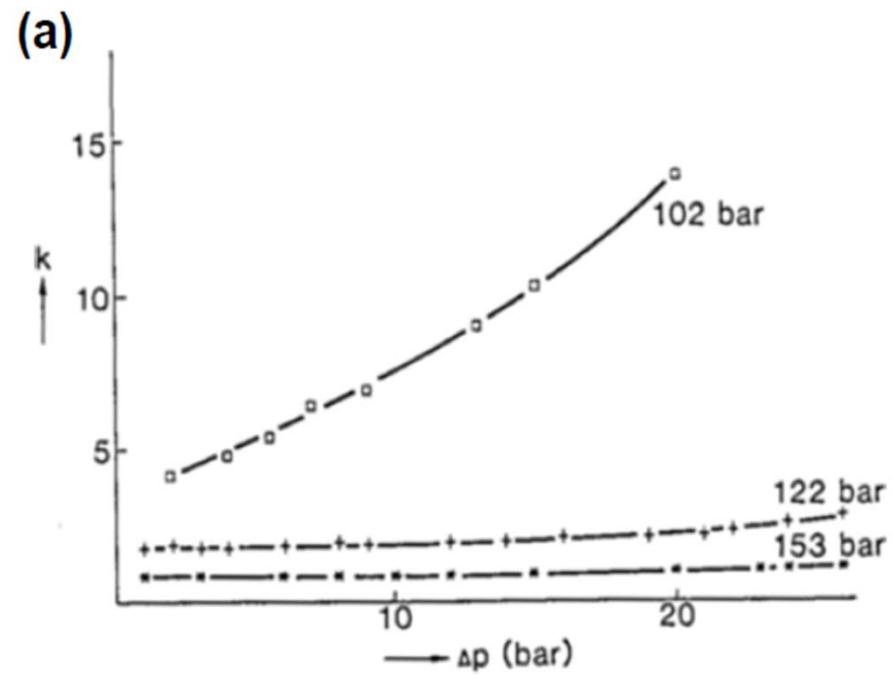
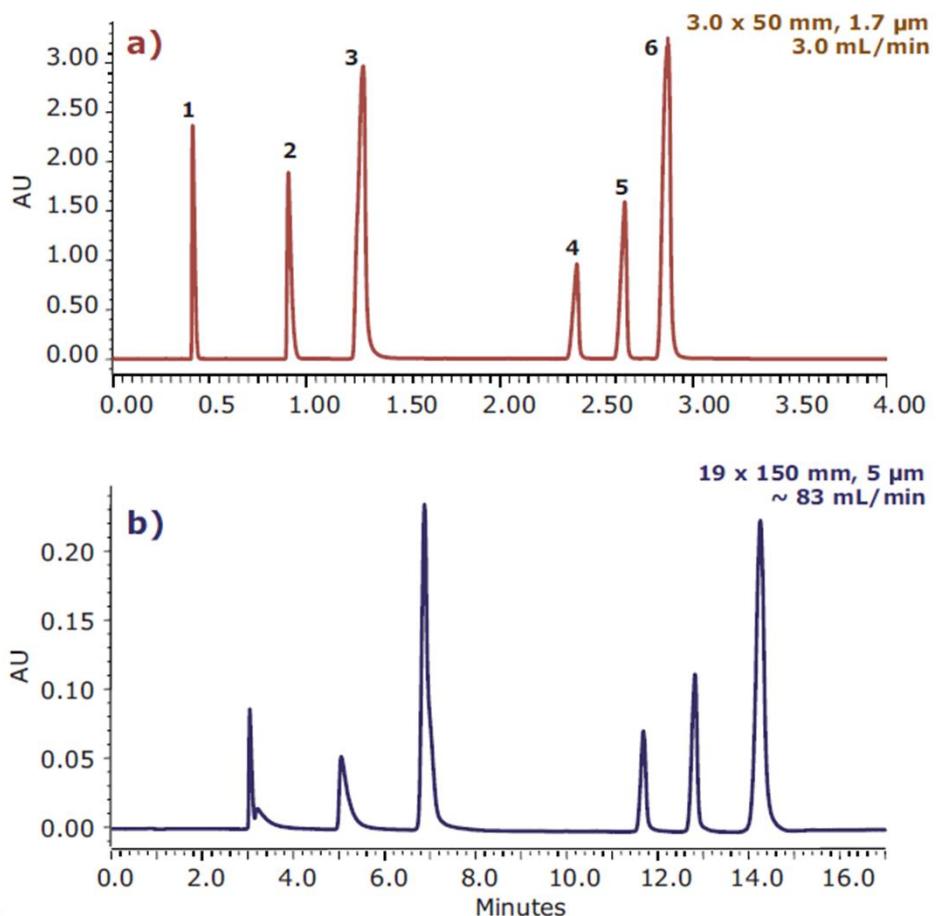
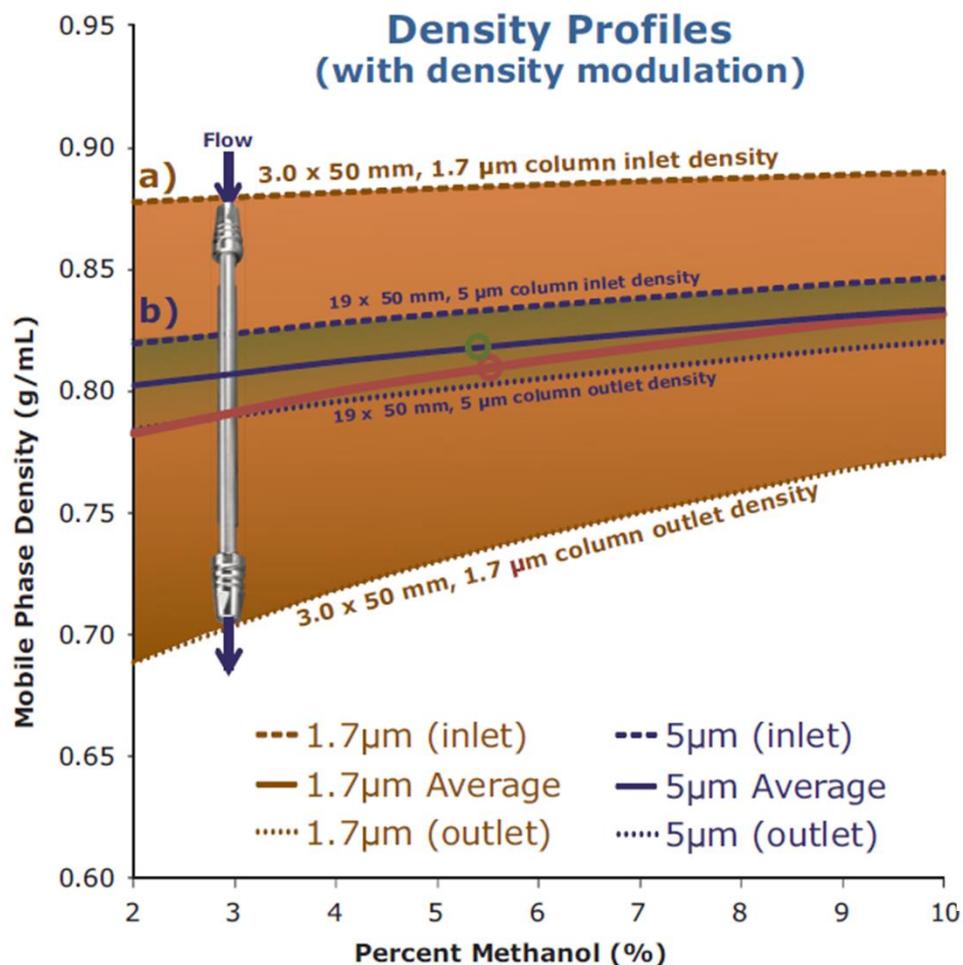


Figura - Variação do fator de retenção em função da queda de pressão a diferentes temperaturas para o bifenil em uma coluna C18. (a) Temperatura de 50 °C e pressões de entrada de 102, 122 e 153 bar. (b) Pressão de entrada de 122 bar e temperaturas de 40, 50 e 60 °C [4]. Fase móvel: CO2

# EFEITO DA MODULAÇÃO DE DENSIDADES NA RETENÇÃO PARA MAIORES DIÂMETROS COLUNAS E PARTÍCULAS : AMPLIAÇÃO DE ESCALA



Comparação de cromatogramas em sistema analítico e preparativo para uma mistura sintética padrão

Hudalla, Tarafder et al., Waters Application Note APNT 3470356, 2013

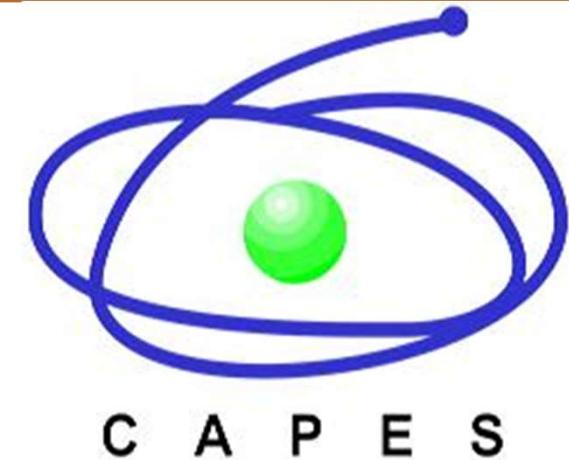
## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A UHPSFC é uma técnica de separação que apresenta vantagens como redução no consumo de solventes orgânicos e menor tempo de análise.
- Redução dos fatores de retenção ( $k$ ) dos compostos com o aumento da porcentagem de etanol.
- O emprego de 30% de etanol resultou na separação dos 4 compostos em um tempo de análise inferior a 2 minutos.
- A composição da fase móvel pode ser ajustada para favorecer determinadas separações.
- Procedimentos para a ampliação da escala do processo dependem de dados em escala analítica e em fundamentos termodinâmicos sobre a influência das propriedades do sistema no coeficiente de retenção dos componentes da mistura.
- A metodologia de ampliação deverá ser comparada com dados em escala semi-preparativa e preparativa.

## AGRADECIMENTOS



*Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico*



**Instituto de Química**

*Departamento de Química Analítica*

# Nuesc

*Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais*

**Faculdade de Engenharia Química**

*Departamento de Materiais e Bioprocessos*



**UNICAMP**