

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CASEARINAS DE
***Casearia sylvestris* COMO PADRÃO FITOQUÍMICO**

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalleiro

Araraquara

2010

FERNANDO PASSARELI

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CASEARINAS DE
***Casearia sylvestris* COMO PADRÃO FITOQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

P286p	Passareli, Fernando Preparação e caracterização de casearinas de <i>Casearia sylvestris</i> como padrão fitoquímico / Fernando Passareli. - Araraquara : [s.n], 2010 183 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Alberto José Cavaleiro 1. Produtos naturais. 2. Casearia sylvestris. 3. Diterpenos clerodânicos. 4. Padrão de referência. I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
· Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

FERNANDO PASSARELI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 05 de março de 2010.

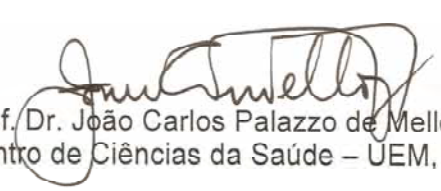
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Fernando Batista da Costa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Centro de Ciências da Saúde – UEM, Maringá

CURRÍCULO

FERNANDO PASSARELI

Dados Pessoais

Filiação: Nelson Passareli e Izaura Aparecida Alamino Passareli

Nascimento: 18/10/1983 - Ribeirão Bonito/SP - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista

Título: Preparação e caracterização de casearinas de *Casearia sylvestris* como padrões fitoquímicos

Orientador: Alberto José Cavaleiro

Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Início março de 2008; conclusão fevereiro 2010

Graduação em Licenciatura em Química.

Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista

Início: 2009; termino: em andamento

Graduação em Química (Bacharelado em Química Tecnológica),

Instituto de Química de Araraquara Unesp, IQ*, Brasil

Título: Relatório De Estágio Supervisionado Realizado Na Empresa Anidro Do Brasil Extrações Ltda - Centroflora

Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Início: 2003; término: 2006

Formação complementar

2007 - 2007 Extensão universitária em Implantação de Sistemas de Gestão da Qualidade. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2007 - 2007 Extensão universitária em Sistema de Gestão da Qualidade. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2007 - 2007 Extensão universitária em Ferramentas para a Melhoria da Qualidade. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2007 - 2007 Extensão universitária em Estatística Básica Aplicada. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

Experiência Profissional

1. Anidro do Brasil Extrações Ltda – CENTROFLORA – 2006/2007

Estagiário no controle de qualidade

Analista do controle de qualidade júnior

2. RLC Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda - RLC QUÍMICA

Analista no controle de qualidade

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. PASSARELI, Fernando, ARAUJO, M. L. G. C.

Comparação Do Desempenho Dos Processos Em Batelada E Batelada Alimentada De Produção de Ácido Clavulânico Por *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em Meio Semi-Sintético In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005, Campinas.

VI COBEQ IC. , 2005.

2. ARAUJO, M. L. G. C., PASSARELI, Fernando, REIS, F.N.D., HERNANDEZ, I.L.C.

Melhoria do processo em batelada alimentada de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 utilizando meio suplementar sintético In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife.

SINAFERM - XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. , 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. PASSARELI, Fernando, BATISTA, A. N. L., CAVALHEIRO, A. J.

Desenvolvimento de método para purificação de casearina U e J de *Casearia sylvestris* em CLAE preparativo C-18, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

17 Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti

2. PASSARELI, Fernando, BATISTA, A. N. L., CAVALHEIRO, A. J.

Otimização de condições preparativas em CLAE-C18 para purificação de casearinas de *Casearia sylvestris*, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

32 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

3. PASSARELI, Fernando, BATISTA, A. N. L., BOLZANI, V. S., CAVALHEIRO, A. J.

Purification of casearins U and J by preparative HPLC in recycle mode, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2nd Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) and XXVII RESEM

4. PASSARELI, Fernando, ARAUJO, M. L. G. C.

Processos de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 In: XVIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2006, Bauru.

XVIII CIC - Unesp. , 2006.

5. PASSARELI, Fernando, ARAUJO, M. L. G. C.

Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em meios

contendo precursores In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005, Araraquara.

XVII CIC - Congresso de Iniciação Científica - Unesp. , 2005.

Eventos

Participação em eventos

1. **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP**, 2008.
(Simpósio)

2. **III Workshop do NuBBE - Conservação e Uso Sustentável da Diversidade de Plantas Do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Bioprodutos**, 2008.
(Outra)

Organização de evento

38 Semana da Química do Instituto de Química da Unesp, 2008

Aos meus pais, Nelson (*in memoriam*) e Izaura
pelos ensinamentos, companheirismo e apoio
em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Alberto José Cavalheiro pela orientação incondicional e amizade.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química que sempre estiveram à disposição para tirar dúvidas, esclarecimentos.

Aos professores, funcionários, alunos do Departamento de Química Orgânica, pelos ensinamentos, convivência e amizade.

Ao Dr. Nivaldo Borale pelos experimentos de ressonância magnética nuclear.

À prof. Dra. Marisa Spirandeli Crespi, prof. Dr. Massao Yonashiro e os alunos de mestrado Douglas, Flávio e aluno de doutorado Claudio pela realização das análises térmicas.

Ao prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e ao Químico José Carlos Tomaz pelos experimentos de massas.

Ao laboratório de análise elementar da Universidade Federal de São Carlos pela realização das análises elementar.

À CAPES pelo primeiro ano de bolsa e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo segundo ano de bolsa. Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

Ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, NuBBE, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara- UNESP.

“A educação sozinha não transforma a sociedade, sem
ela tampouco a sociedade muda.”

(Paulo Freire)

RESUMO

Tendo em vista o pequeno acervo de padrões de referência disponíveis para uso no controle de qualidade de fitoterápicos preparados a partir de espécies nativas brasileiras, este trabalho tem como objetivos preparar e caracterizar padrões de alta pureza de casearinas a partir de *Casearia sylvestris*, uma planta nativa da flora brasileira, que há muito tempo vem sendo usada pela população. A estratégia utilizada para o isolamento das casearinas consistiu no fracionamento do extrato etanólico das folhas por extração em fase sólida utilizando sílica e carvão ativo, cromatografia em coluna em fase normal, além de desenvolvimento de método em CLAE preparativo em fase reversa no modo isocrático e reciclante. Para as análises por CLAE preparativo no modo isocrático, inicialmente, alguns parâmetros como resolução, carga e volume de injeção foram otimizados em coluna analítica e posteriormente foi feita a transferência de escala para coluna preparativa utilizando fator de escalonamento de 21,2. A transferência foi adequada, resultando no isolamento de 10,5 mg da casearina J, 30,0 mg da casearina X e 3,0 mg da casearina Z. Em modo reciclante, foram isolados 60,0 mg da caseargrewiina F. As análises de pureza dessas substâncias foram feitas através de CLAE-DAD, calculando-se primeiramente a pureza de pico, que foi de 100% para as três casearinas analisadas e, posteriormente, a pureza cromatográfica, pelo método de normalização de área, sendo de 85,5, 97,2, e 98,6% para as casearinas J, X e caseargrewiina F, respectivamente. As análises por CLAE-DAD-EM foram importantes para confirmar o resultado de pureza de pico, assim como para obter os dados de massas dos contaminantes presentes nessas amostras. O grau de pureza por DSC não pôde ser obtido, devido à ausência do pico referente à fusão das casearinas, inferindo que as substâncias sejam amorfas. A partir das curvas TG/DTG/DTA foi possível sugerir a ausência de impurezas voláteis, umidade e cinzas. A análise por RMN de ^1H e ^{13}C possibilitou a identificação das casearinas, assim como a detecção de sinais referentes às impurezas. Assim, a aplicação em conjunto das diferentes técnicas (CLAE-DAD, CLAE-EM, RMN e métodos térmicos) é a melhor estratégia para a caracterização de padrões de alta pureza de casearinas para o uso em controle de qualidade e/ou testes biológicos.

Palavras-chave: Padrões de referência. *Casearia sylvestris*. Diterpenos clerodânicos. Casearinas. Determinação de pureza.

ABSTRACT

Taking into account the few library of reference standards available for the use in quality control of phytotherapeutic agents from Brazilian native species, the aim of this work was to prepare and characterize high purity standards of casearins from *Casearia sylvestris*, a native plant of the Brazilian flora that has been used traditionally by population for a long time as remedy. The strategy to isolate the casearins was to fractionate the ethanolic extract from leaves by solid phase extraction using silica and active charcoal, column chromatography (normal phase) and, additionally, the method development in preparative HPLC (reverse phase) using isocratic and recycling mode. For the analyses by preparative HPLC using isocratic mode, firstly of all some parameters like resolution, amount of sample and volume injection were optimized in analytical column and then the scale-up to preparative column was carried out using a scale factor of 21.2. The scale-up was appropriate, leading to the isolation of 10.5 mg of the casearin J, 30.0 mg of the casearin X and 3.0 mg of the casearin Z. In recycling mode, 60.0 mg of the caseargrewiin F were isolated. The purity analyses of these substances were carried out by HPLC-DAD, firstly measuring the peak purity, which was 100.0% for the three analyzed casearins, and then, the chromatographic purity, by the area normalization method, which was 85.5, 97.2 and 98.6% for the casearins J, X and caseargrewiin F, respectively. The HPLC-DAD-MS analyses were important to confirm the peak purity results as well as to obtain the mass data of contaminants which are usually present in these samples. The measurement of the purity degree by DSC method was not possible due to the absence of fusion peak, thus it suggests an amorphous state for these substances. From the TG/DTG/DTA curves, it was possible to suggest the absence of volatile impurities, moisture and ash. The ^1H and ^{13}C NMR analyses enabled the identification of casearins and the detection of the signals of impurities. Thus, the application of different techniques jointly, (HPLC-DAD, LC-MS, NMR and thermal methods) was found to be the best strategy to characterize high purity standards of casearins aiming its use in quality control and/or biological tests.

Key-words: Reference standards. *Casearia sylvestris*. Clerodane diterpenes. Casearins, purity determination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação do esqueleto carbônico das casearinas.	37
Figura 2- CCDC das 50 subfrações FA obtidas da CC-Si.	49
Figura 3- CCDC das 17 subfrações FA após reunião conforme Tabela 1.	49
Figura 4- Diagrama de barras representando a distribuição de massas das 17 subfrações FA obtidas a partir da CC-Si.	50
Figura 5- Cromatogramas das subfrações FA, obtidos em CLAE-DAD fase reversa C-18 e registrados em 235 nm.	52
Figura 6- Espectro no UV de caseargrewiina F e das subfrações FA18, FA21 e FA24.	53
Figura 7- Cromatogramas do desenvolvimento cromatográfico para o ajuste da força de eluição da FM ($k' = 7 - 18$) em CLAE-UV da subfração FA9 com mistura binária H ₂ O/MeOH.	54
Figura 8- Cromatogramas do desenvolvimento cromatográfico para o ajuste da força de eluição da FM ($k' = 7 - 18$) em CLAE-UV da subfração FA9 com mistura ternária H ₂ O/MeOH/ACN.	55
Figura 9- Cromatogramas do desenvolvimento cromatográfico para o ajuste da força de eluição da FM ($k' = 7 - 18$) em CLAE-UV da subfração FA9 com mistura binária H ₂ O/ACN.	56
Figura 10- Diagrama de superfície para determinação da melhor resolução para a composição de FM (H ₂ O/MeOH/ACN 30:50:20 (v/v)).	57
Figura 11- Cromatograma da subfração FA9, obtido na condição ótima indicada pelo gráfico de superfície de resposta da Figura 10, utilizando o equipamento CLAE-1.	58
Figura 12- Cromatogramas obtidos nos testes de carga, volume injeção da amostra e vazão da FM (as condições estão nos cromatogramas).	59
Figura 13- Cromatogramas obtidos nos testes de carga, volume injeção da amostra e vazão da FM (as condições estão nos cromatogramas).	60
Figura 14- Cromatogramas obtidos nos testes de carga, volume injeção da amostra e vazão da FM (as condições estão nos cromatogramas).	61
Figura 15- Cromatogramas em modo analítico e preparativo, a partir das condições otimizadas: volume de injeção (80 µL/ 1,7 mL), carga (0,56 mg/ 11,9 mg) e vazão (1,6 mL/min/ 33 mL/min), (coluna Phenomenex® Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10 µm).	62

- Figura 16-** Cromatograma em modo preparativo para avaliação da pureza dos dois picos majoritários, volume injeção (1,7 mL), carga por injeção (11,9 mg) e vazão (33,0 mL/min), Phenomenex® Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10 µm. 63
- Figura 17-** Avaliação da pureza em CLAE analítico após reunião dos tubos de ensaio, primeiro pico acima e segundo pico abaixo. 64
- Figura 18-** Cromatograma em modo preparativo para avaliação da pureza dos dois picos majoritários, carga por injeção (7,0 mg) e vazão (33,0 mL/min), Phenomenex® Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10µm. 65
- Figura 19-** Cromatograma em modo preparativo para avaliação da pureza dos dois picos majoritários, carga por injeção (28,0 mg) e vazão (33,0 mL/min), Phenomenex® Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10 µm. 65
- Figura 20-** Cromatogramas em modo analítico (acima) e preparativo (abaixo) massa aplicada de 78,1 mg. Coluna Phenomenex® Luna C-18. 250 x 4,6 mm, 5 µm, vazão 0,8 mL/min e Coluna Phenomenex® Gemini C-18. 250 x 21,2 mm, 5 µm, vazão de 17 mL/min). 67
- Figura 21-** Cromatogramas em modo analítico (acima) e preparativo modo reciclante (abaixo); volume de injeção (7,0 mL), carga (50,0 mg) e vazão (17 mL/min), (coluna Phenomenex® Gemini C-18. 250 x 21,2 mm, 5 µm). 68
- Figura 22-** Casearina J e principais correlações encontradas no mapa de contorno HMBC, respectivamente. 70
- Figura 23-** Casearina X 72
- Figura 24-** Caseargwiina F 74
- Figura 25-** Casearina Z e correlações apresentadas no mapa de contorno HMBC, respectivamente. 77
- Figura 26-** Análise da pureza de pico em CLAE-DAD em coluna C-18 para as casearinas J e X, e caseargwiina F. 79
- Figura 27-** Análise da pureza de pico em CLAE-DAD em coluna fenil-hexil para as casearinas J e X, e caseargwiina F 80
- Figura 28-** Espectro obtido no UV do produto de degradação da casearina J, pico em 23,5 min. 80
- Figura 29-** Pureza cromatográfica da casearina J determinada em coluna C18 após coleta do pico e em colunas C18 e fenil-hexil após evaporação total do solvente e

dissolvido em MeOH, na concentração de 0,2 mg/mL, condição de análise

item 3.6. 81

Figura 30- Pureza cromatográfica da casearina X determinada em coluna C18 após coleta do pico e em colunas C18 e fenil-hexil após evaporação total do solvente e dissolvido em MeOH, na concentração de 0,4 mg/mL, condição de análise no item 3.6. 82

Figura 31- Pureza cromatográfica da caseargrewiina F determinada em coluna C18 após coleta do pico e em colunas C18 e fenil-hexil após evaporação total do solvente e dissolvido em MeOH, na concentração de 0,2 mg/mL, condição de análise no item 3.6. 83

Figura 32- CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD branco e da casearina J em coluna fenil-hexil e C18, gradiente linear de H₂O/MeOH 35:65 à 00:100 em 15 min., mais 5 min condição final, também é mostrado a ampliação resultante da presença dos contaminantes. 85

Figura 33- CLAE-DAD-EM da casearina X em coluna fenil-hexil e C18, gradiente linear de H₂O/MeOH 35:65 à 00:100 em 15 min, mais 5 min condição final, também é mostrado a ampliação resultante da presença dos contaminantes. 86

Figura 34- CLAE-DAD-EM da caseargrewiina F em coluna fenil-hexil e C18, gradiente linear de H₂O/MeOH 35:65 à 00:100 em 15 min., mais 5 min condição final, também é mostrado a ampliação resultante da presença dos contaminantes. 87

Figura 35- Curva DSC para a caseargrewiina F apresentando a região referente à transição vítrea (razão de aquecimento de 20 °C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético, cadinho de alumínio). 89

Figura 36- Curva TG/DTG e TG/DTA para a caseargrewiina F (razão de aquecimento 20 °C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético, cadinho de alumina). 89

Figura 37- Curva TG/DTG e TG/DTA para a casearina J (razão de aquecimento de 20 °C/min em atmosfera dinâmica de ar sintético, cadinho de alumina). 90

Figura 38- Curva TG/DTG e TG/DTA para a casearina X (razão de aquecimento 20 °C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético, cadinho de alumina). 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Casearinas e similares isoladas de <i>Casearia sylvestris</i> .	39
Tabela 2- Características físicas das casearinas obtidas de <i>C. sylvestris</i> .	40
Tabela 3- Identificação das subfrações, balanço de massa da CC-Si e rendimento em relação à 16,8 g da fração EFS-2	50
Tabela 4- Composição da FM e resolução cromatográfica dos picos com menor resolução	57
Tabela 5- Avaliação da pureza cromatográfica após injeção em CLAE preparativo.	64
Tabela 6- Avaliação da pureza cromatográfica após injeção em CLAE preparativo com carga de 7 mg.	65
Tabela 7- Avaliação da pureza cromatográfica após injeção em CLAE preparativo com carga de 28 mg.	66
Tabela 8- Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C , ^1H obtidos em 125 e 500 MHz, respectivamente, gHMBC e gCOSY, em piridina-d5 para a casearina J.	71
Tabela 9- Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H obtidos em 125 e 500 MHz, respectivamente, em piridina-d5 para a casearina X.	73
Tabela 10- Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H obtidos em 75 e 300 MHz, respectivamente, em piridina-d5 para a caseargrewiina F.	75
Tabela 11- Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H obtidos em 75 e 500 MHz, respectivamente, em piridina-d5 para a casearina Z.	78
Tabela 12- Características termogravimétricas da caseargrewiina F em atmosfera dinâmica de ar sintético e razão de aquecimento de 20 °C/ min	89
Tabela 13- Características termogravimétricas da casearina J em atmosfera dinâmica de ar sintético e razão de aquecimento de 20 °C/ min.	90
Tabela 14- Características termogravimétricas da casearina X em atmosfera dinâmica de ar sintético e razão de aquecimento de 20 °C/ min.	91
Tabela 15- Resultados da análise elementar para as casearinas J, X e caseargrewiina F.	91
Tabela 16- Resultado de pureza para as casearinas isoladas de <i>Casearia sylvestris</i> .	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila
AcOEt - Acetato de etila
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCR - *Community Bureau of Reference*
c - concentração
CCD - Cromatografia de camada delgada
CCDC - Cromatografia de camada delgada comparativa
CC-Si - Coluna cromatográfica em sílica
CG - Cromatografia de Gasosa
CHCl₃ - Clorofórmio
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
d - dubleto
DAD - Detector de arranjos de diodos
DSC - Calorimetria exploratória diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*)
DTA - Análise térmica diferencial
DTG - Derivada da termogravimetria
EFS - Extração em fase sólida
ELSD - Detector de espalhamento de luz evaporativo
EM - Espectrometria de massas
EP - *European Pharmacopeia*
EtOH - Etanol
FDA - *Food and Drug Administration*
FE – Fase estacionária
FM - Fase móvel
H₂O - água
Hex - Hexano
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPA - Isopropanol
IPEM - Instituto de Pesos e Medidas do Estado de São Paulo
ISO - International for Standardization
IV - infravermelho
MeOH - Metanol
MRC - Materiais de referência certificados
NIST - *National Institute of Standards and Technology*
PIB - Produto Interno Bruto
piridina-d₅ - piridina deuterada
PNPMF - Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico
PPI - Índice de pureza de pico
PPM - Índice de similaridade do pico
q - quadrupletto
RDC - Resolução de Diretoria Colegiada
RE - Resolução
RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
s- singleto
SUS - Sistema Único de Saúde
t - tripleto

TG - Termogravimetria

USP-NF - *United States Pharmacopeia- National Formulary*

UV - Ultravioleta

WHO - *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$ - rotação ótica específica

$T_{\text{on set}}$ – temperatura inicial do pico

T_g – Temperatura de transição vítrea

$T_{g \text{ médio}}$ - Temperatura de transição vítrea média

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Objetivos	22
3. Revisão da literatura	23
3.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos	23
3.2. Padrão de referência para fitoterápico e legislação	24
3.3. Padrões	24
3.4. Metrologia	25
3.5. Caracterização de padrões	27
3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)	29
3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massa (CLAE-EM)	30
3.8. Análise elementar	31
3.9. Análise térmica	31
3.10. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa	32
3.11. <i>Casearia sylvestris</i>	33
3.11.1. Extrato Etanólico das Folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	34
3.11.2. Extrato metanólico e aquoso das folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	35
3.11.3. Óleo essencial	36
3.11.4. Diterpenos Clerodânicos	37
4. Materiais	41
5. Métodos	44
5.1. Metodologia para purificação das casearinas e análise de pureza	44
5.2. Cromatografia em coluna	45
5.3. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	45
5.4. Pré-tratamento das amostras para análise em CLAE-DAD	45
5.5. CLAE analítico	46
5.6. Desenvolvimento do método em CLAE preparativo e purificação	46
5.7. Identificação das casearinas	48
5.8. Avaliação da pureza	48
6. Resultados e discussão	49
6.1. Cromatografia em coluna e CCDC	49
6.2. Pré-tratamento das subfrações e análise por CLAE-DAD analítico	51
6.3. Desenvolvimento de método em CLAE preparativo	53
6.4. Isolamento e purificação em CLAE preparativo	62
6.4.1 Isolamento no modo isocrático	62
6.4.2 Isolamento no modo reciclante	67
6.5. Identificação e elucidação estrutural	68
6.5.1. Casearina J	69
6.5.2. Casearina X e caseargrewiina F	71
6.5.3. Casearina Z	76
6.6. Avaliação da pureza	79
6.6.1 Pureza Cromatográfica	79
6.6.2. CLAE-DAD-EM	84
6.6.3. Análise térmica	88
6.6.4. Análise elementar	91
6.6.5. Cálculo da pureza	92

7. Conclusão	93
Referências	95
ANEXOS	101

1. Introdução

As plantas medicinais são usadas há muitos anos para tratar uma grande variedade de doenças. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso de fitoterápicos se espalhou tanto nos países em desenvolvimento quanto nos industrializados, como uma maneira de complementar o tratamento e até a prevenção de doenças. (WORLD..., 2009; MACIEL et al., 2002; CAPASSO et al., 2000).

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou em 2009 a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Essa lista é constituída por 71 espécies de plantas medicinais que devem ser priorizadas nos estudos e na geração de produtos fitoterápicos, dessa forma estimulando a pesquisa e produção (BRASIL, 2009a).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão responsável pela fiscalização do controle sanitário da produção e comercialização dos produtos farmacêuticos no Brasil, publicou em 2004 a RDC número 48 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, visando sua padronização, pois para registrar o produto fitoterápico devem ser encaminhados os resultados de testes de segurança e eficácia do produto, de acordo com o que é preconizado na resolução. Em conjunto, a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no controle de qualidade devem seguir a resolução RE número 899, assim como a utilização de padrões (AGÊNCIA..., 2008b; AGÊNCIA..., 2008c).

O uso de padrões químicos no controle de qualidade torna-se importante para oferecer uma maior confiabilidade e credibilidade às medições. Esses padrões podem ter diversas denominações, tais como: padrão primário, secundário, de trabalho e referência. Na área de produtos naturais, os padrões fitoquímicos podem ser obtidos pelo isolamento a partir de uma fonte vegetal ou pela síntese total ou parcial. Algumas organizações como a *National Institute of Standards and Technology* (NIST) vendem padrões químicos e outras instituições como *United States Pharmacopeia- National Formulary* (USP-NF) e *European Pharmacopeia* (EP) fornecem esses padrões com garantia de uso limitado às suas monografias (O PAPEL..., 2008).

A caracterização dos padrões é uma etapa importante no desenvolvimento destes e de um fitoterápico, para estabelecer a qualidade e credibilidade às medições e aos produtos. As técnicas espectrométricas (RMN, EM, IV, UV) são ferramentas importantes no primeiro passo desse processo, que é a caracterização estrutural dessas substâncias.

O segundo passo é examinar sua pureza onde o teor de substâncias orgânicas é geralmente determinado por métodos relativos, tais como a cromatografia e a análise térmica. Os teores de água e de solventes residuais precisam ser estabelecidos e a análise elementar revelará se há ou não impurezas inorgânicas presentes que devam ser consideradas (MA et al., 2009; UNITED..., 2008). Quando possível as impurezas presentes podem ser identificadas. Assim, o resultado de pureza será a diferença entre o teor do analito de interesse e das impurezas presentes (umidade, resíduo de solvente etc...).

Dentre as espécies inseridas na RENISUS está *Casearia sylvestris* (Salicaceae), uma planta nativa do Brasil e encontrada em diversos países da América do Sul. É conhecida popularmente como guaçatonga. O gênero *Casearia* é representado no Brasil por cerca de 70 espécies.

Diversos estudos demonstram que esta espécie tem grande potencial fitoterápico por apresentar diversas atividades biológicas como: antiúlcera, antiofídica, anti-inflamatória, antitumoral (ESTEVES et al., 2005; BASILE et al., 1990; DE MESQUITA et al., 2005; ESTEVES et al., 2005; MAISTRO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006; SANTOS, 2008; OLIVEIRA et al., 2009, SANTOS et al., 2010). Algumas dessas atividades (citotóxica, antiúlcera, antitumoral) foram relacionadas aos diterpenos clerodânicos (casearinas). Por essas razões e considerando o pequeno acervo de padrões de origem vegetal, e principalmente das plantas nativas do Brasil, torna-se importante o desenvolvimento de métodos para a purificação e obtenção dessas substâncias, com a finalidade do uso no controle de qualidade de fitoterápico e/ou fitofármaco a partir de *C. sylvestris*.

2. Objetivos

Com a crescente utilização de fitoterápicos no tratamento e prevenção de doenças, as regulamentações na Agência Nacional de Vigilância Sanitária segundo a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004 quanto ao registro dos fitomedicamentos e o pequeno acervo de padrões de referência disponível para uso no controle de qualidade, este trabalho tem como objetivos preparar e caracterizar padrões de alta pureza de casearinas a partir de *C. sylvestris*, uma planta nativa da flora brasileira, com uso antigo na cultura popular e potencial para comercialização como fitoterápico padronizado.

Objetivos específicos:

- Desenvolver método de purificação de casearinas de *C. sylvestris* em CLAE preparativa em fase reversa C-18;
- Estudar a aplicação de RMN, EM, CLAE-DAD de fase reversa, análise elementar e análise térmica na determinação da pureza de casearinas.

3. Revisão da literatura

3.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos

Muitas comunidades e grupos étnicos na maioria das vezes têm como recursos terapêuticos as plantas medicinais, que são utilizadas no tratamento e cura de doenças. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares (MACIEL et al., 2002) e a venda dessas plantas e de fitoterápicos tem aumentado consideravelmente nos países industrializados (CAPASSO et al., 2000).

Em 2008, foi aprovado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) em conjunto com a criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, segundo a portaria interministerial (2.960/2008). Um dos objetivos do programa é a inserção com segurança do uso de plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, vai promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros (BRASIL, 2009b, 2009c)

Neste contexto das políticas relacionadas ao PNPMF, o Ministério da Saúde publicou em 2009 a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), constituída por 71 espécies de plantas medicinais que devem ser priorizadas nos estudos e na a geração de produtos fitoterápicos, dessa forma estimulando a pesquisa e produção dos fitoterápicos no país (BRASIL, 2009a).

A ANVISA, na RDC nº 48 de 16 de Março de 2004 que trata a respeito do “registro de medicamento fitoterápico”, traz as definições de droga vegetal e fitoterápico:

- **Droga vegetal:** planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.
- **Fitoterápico:** medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua

composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais

Os medicamentos fitoterápicos estão cada vez mais populares em países desenvolvidos e em desenvolvimento para complementar o tratamento e até para prevenir doenças (CAPASSO et al., 2000). Este mercado está em crescente desenvolvimento e necessita de tecnologias para preparar e caracterizar padrões “fitoquímico” para serem usado no controle de qualidade e para a padronização dos produtos, desta forma, garantindo a eficácia desses.

3.2. Padrão de referência para fitoterápico e legislação

A validação da metodologia analítica para o controle de qualidade dos fitoterápicos deve ser feita de acordo com o disposto na resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Esta determina que a validação deva garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Assim, o uso de padrões de alta qualidade é importante na identificação e quantificação de marcadores químicos da planta medicinal e do fitoterápico (BRASIL, 2008c).

Devem-se utilizar padrões de referência para a padronização do extrato da planta, conforme preconizado na RE 899/03. Não havendo padrões de referência para fitoterápicos, a resolução já prevê o uso de padrões de trabalho (BRASIL, 2008a).

Ao qualificar um extrato, a melhor opção é através dos marcadores isolados (padrão primário) e perfil cromatográfico. Em seguida, deve-se usar esse extrato qualificado como padrão de trabalho (padrão secundário) e perfil cromatográfico. Deve-se usar extrato padronizado em que cada um dos marcadores já está definido com quantidades mínimas. Pode-se também utilizar diretamente os extratos padrões oficializados (por exemplo, aqueles disponibilizados pela USP), desde que acompanhado do perfil cromatográfico (BRASIL, 2008a).

3.3. Padrões

Devido à grande variedade de plantas medicinais conhecidas e a serem descobertas com alguma atividade fitoterápica (biológica), e considerando que os produtos naturais e seus derivados têm importância sócio-econômica cada vez maior, faz-se necessário à utilização de

padrões com altos níveis de pureza para o controle de qualidade de fitoterápicos (O PAPEL..., 2008).

Diversas terminologias são utilizadas para a definição de padrões com características diferentes. Para o IPEM (INSTITUTO DE..., 2008), são válidas as seguintes definições para alguns padrões:

- “padrão primário” ou “padrão de referência” é designado ou amplamente reconhecido como tendo as mais altas qualidades metrológicas e cujo valor é aceito sem referência a outros padrões de mesma grandeza. Está disponível em um dado local ou em uma dada organização, a partir do qual as medições lá executadas são derivadas, sejam elas drogas vegetais ou drogas convencionais;
- “padrão secundário” ou “padrão de trabalho” é definido como aquele padrão cujo grau de pureza é estabelecido por comparação com um padrão primário da mesma natureza. É utilizado rotineiramente para calibrar ou controlar medidas materializadas, instrumentos de medição ou materiais de referência.

A *Food and Drug Administration* (FDA) trata os padrões primários e de referência como sinônimos, assim como padrão secundário e de trabalho (UNITED..., 2008).

Os padrões de referências vegetais podem ser produzidos de duas maneiras: pelo isolamento a partir de fontes naturais (material vegetal) ou pela síntese parcial ou total, isto é, artificialmente, via processo químico. As análises para determinação do grau de pureza devem ser realizadas em pelos menos três laboratórios diferentes, segundo descrito na *United State Pharmacopeia* (USP/NF), mas a tecnologia e os custos para a preparação podem inviabilizar o processo. Além disso, as substâncias de interesse podem estar em baixas concentrações nas fontes vegetais em estudo, tornando o processo inviável financeiramente. Nesses casos podem-se utilizar outras fontes com maior teor da mesma substância. (O PAPEL..., 2008).

3.4. Metrologia

Os materiais de referência certificados (MRC) são produzidos, certificados e utilizados de acordo com as instituições certificadoras desses materiais, entre elas a ISO (*International for Standardization*) e BCR (*Community Bureau of Reference*) (TRAPMANN; SCHIMMEL; KRAMER, 2002), FDA, WHO (*World Helth Organization*). Por isso, torna-se importante o estudo do material a ser certificado assim como seus métodos de análise e a confiabilidade

destes. No entanto, o grau de estabilidade de um MRC não é comparável ao de um produto comercial podendo não ter as mesmas características (PAUWELS; SCHIMMEL; LAMBERTY, 1998).

A metrologia, definida como a “ciência da medição”, tem como foco principal prover confiabilidade, credibilidade, universalidade e qualidade às medidas. Como as medições estão presentes, direta ou indiretamente, em praticamente todos os processos, a abrangência da metrologia é imensa, envolvendo a indústria, o comércio, a saúde e o meio ambiente, para citar apenas algumas áreas. Estima-se uma parcela considerável do PIB nacional dos países industrializados sejam dedicados aos processos de medição (INSTITUTO..., 2008a).

Com o crescente uso dos métodos de medidas em praticamente todas as áreas, foi criado em 1993 o Comitê Consultivo para Quantidade de Matéria nesta mesma época iniciou-se o desenvolvimento da Metrologia Química no cenário mundial. No Brasil, o marco inicial da Metrologia Química foi o Seminário "Metrology in Chemistry - A New Challenge for the Americas", ocorrido no Rio de Janeiro, de 3 a 4 de novembro de 1997 (INSTITUTO ..., 2008b).

O INMETRO criou em junho de 2000 a Divisão de Metrologia Química. Dentro desta divisão, a Metrologia em Química Orgânica iniciou suas atividades em julho de 2002 tendo como missão o desenvolvimento e a certificação de materiais de referência, o desenvolvimento e a validação de procedimentos de referência, a realização de análises, atendendo demanda da sociedade e disseminar o conhecimento metrológico através de palestras, seminários, cursos, participação em congressos e publicação de artigos em revistas especializadas (INSTITUTO ..., 2008c).

Com a importância crescente dessa área, faz-se necessário uma boa credibilidade das medições e esta está fortemente associada à rastreabilidade, que é definida como “Propriedade do resultado de uma medição ou do valor de um padrão estar relacionado a referências estabelecidas, geralmente padrão nacional ou internacional, através de uma cadeia contínua de comparações, todas tendo incertezas estabelecidas” (INSTITUTO ..., 2008a). Contudo a rastreabilidade a um sistema comumente aceito é uma condição essencial para garantir a comparabilidade das medições e é um requisito básico para se constituir um material de referência de todas as classes (PAUWELS; SCHIMMEL; LAMBERTY, 1998).

Com a importância crescente da metrologia no Brasil e em todo o mundo e a recente aceleração da globalização, potencializando a demanda por metrologia, em virtude da grande necessidade de harmonização nas relações de trocas comerciais, atualmente muito mais

intensas, complexas e envolvendo um grande número de grandezas a serem medidas com exatidão e credibilidade, faz-se necessário o uso de padrões com a mais elevada qualidade metrológica em todas as áreas (INSTITUTO..., 2008a). Nesta área de padrões de alta qualidade o mercado de fitoterápicos mostra-se atraente devido ao pequeno número de fornecedores e também ao grande potencial dos fitoterápicos no país, que possui a maior biodiversidade do mundo.

3.5. Caracterização de padrões

Considerando as substâncias de referências como a base para estabelecer a qualidade e credibilidade às medidas analíticas, é evidente a importância da qualidade dos padrões de referência no sentido de promover um nível confiável e documentado de qualidade para garantir segurança e eficácia da matéria-prima e produtos vegetais (O PAPEL..., 2008). Nesse sentido faz-se necessário a aplicação de diversas técnicas para chegar a um nível aceitável de pureza para as substâncias.

A USP e a *European Pharmacopeia* (EP) oferecem substâncias de referência primárias para uso com métodos especificados em suas respectivas monografias, além de outras instituições como a *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Do ponto de vista regulatório, a respeito da alta pureza, estes padrões farmacopéicos não são válidos para propósitos analíticos, além do uso nos métodos descritos nas respectivas monografias (O PAPEL..., 2008).

Finalmente, qualquer substância química com estrutura conhecida pode ser usada como um padrão para teste de identificação (qualitativo), embora seus teores não estejam definidos (pureza). Por exemplo, em uma análise de perfil químico (*fingerprint*) por cromatografia de camada delgada (CCD), a comparação da constituição de um produto/extrato vegetal, com substâncias marcadoras, revela se as substâncias desejadas estão ou não presentes (O PAPEL ..., 2008).

As etapas para a caracterização de um padrão químico estão melhor descritas no *Guidance for Industry* (2000), disponível no site da FDA (UNITED..., 2008), e serão apresentadas abaixo, complementadas com informações de outros autores.

Desta forma, o primeiro passo ao definir uma substância química de referência, é sempre sua identificação. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a

espectrometria de massas (EM) são ferramentas importantes para a caracterização estrutural (UNITED..., 2008).

O segundo passo é examinar sua pureza onde o teor de substâncias orgânicas em diferentes substratos é geralmente determinado por métodos relativos, tais como técnicas cromatográficas (método de normalização de área) e térmicas (MA et al., 2009; UNITED ..., 2008). Novamente, isso requer uma combinação de diferentes métodos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou a Cromatografia Gasosa (CG) são técnicas típicas, usadas na busca por impurezas orgânicas e na determinação da pureza relativa, através do cálculo de área normalizada, assim como a CCD (UNITED ..., 2008), além da análise térmica por DSC (MA et al., 2009).

Os teores residuais de água e de solventes precisam ser estabelecidos e a análise elementar revelará se há ou não impurezas inorgânicas presentes que devam ser consideradas (UNITED ..., 2008), a análise térmica por DSC e TG são utilizadas para determinar a pureza e estabilidade térmica dos compostos, além também da identificação de impurezas voláteis (MACÊDO et al., 2000, MA et al., 2009). Em alguns casos particulares, os testes de pureza podem incluir outros métodos, tais como rotação óptica ou ponto de fusão e, no caso de líquidos, o ponto de ebulição.

Finalmente, como um terceiro passo, o conteúdo químico é determinado através de CLAE ou CG, podendo ser utilizado a técnica de CLAE-EM para a identificação das impurezas (UNITED ..., 2008; MA et al., 2009). Contudo, deve-se tomar cuidado ao estabelecer o conteúdo químico com base somente na CLAE E CG, pois são métodos relativos que não indicam o valor absoluto. Desta forma, é amplamente aceito que o grau de pureza deve ser estabelecido com base em pelo menos dois métodos independentes, para a certificação de que o valor assinalado é o valor "verdadeiro". A seguir, as quantidades de impurezas totais (resíduo de água, solventes e inorgânicos) são subtraídas desse valor obtido por métodos cromatográficos (UNITED ..., 2008).

The Directorate for... (2007) apud Ma et al. (2009); World Health Organization (2003) apud Ma et al. (2009) descrevem o cálculo da pureza levando em consideração a pureza obtida por métodos relativos, impurezas voláteis, teor de umidade e cinzas:

$$\text{Pureza (\%)} = \text{Pureza relativa (\%)} - \text{Impurezas Voláteis (\%)} - \text{Teor de Água (\%)} - \text{Cinzas (\%)}$$

3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

CLAE-DAD é uma técnica importante e amplamente utilizada em análises quantitativas e qualitativas. Na área farmacêutica é comum seu uso na análise de pureza (WIBERG et al., 2004) e na avaliação de componentes de degradação de drogas em testes de estabilidade acelerada além de detectar a presença de substâncias co-eluído com o analito (CESCHEL et al., 2003; PAPADOYANNIS; GIKA, 2004; BRYANT; KINGSWOOD; BELENGUER, 1996).

O objetivo da análise de pureza é separar possíveis impurezas do constituinte principal e, se possível, identificá-las. Essas impurezas podem consistir de produtos de degradação, intermediários de síntese, constituintes da matriz de onde foi isolado a substância (MA et al., 2009; WIBERG et al., 2004) e são importantes para o desenvolvimento de um novo produto farmacêutico (YASUEDA et al., 2004).

Na análise da pureza de uma substância isso muitas vezes implica na determinação do grau de pureza do pico principal, que em regra é a substância ativa, esta análise de pureza de pico é muito usada durante o desenvolvimento de método para confirmar se todos os componentes foram separados e no controle de qualidade para certificar-se que não há impurezas coeluído (PAPADOYANNIS; GIKA, 2004; BRYANT; KINGSWOOD; BELENGUER, 1996). Se o pico principal não está puro, é possível que as impurezas co-eluídas com o ativo não sejam detectadas na análise, dando origem a resultados incorretos de análise. No detector UV/Vis com arranjo de diodos (DAD) as absorbâncias medidas em função do tempo de retenção e de comprimento de onda proporcionam maior confiabilidade para a análise de pureza de pico em relação aos detectores UV/Vis com comprimento de onda de detecção único (WIBERG et al., 2004).

Os softwares dos equipamentos de CLAE-DAD podem utilizar maneiras distintas para fazer a análise de pureza de pico, entre elas estão a análise do índice de pureza de pico (PPI) e o índice de similaridade do pico (PPM). O PPI é definido como o comprimento de onda que divide uma faixa espectral pré-determinada em duas faixas, uma à esquerda e outra à direita, com áreas iguais. O PPI para um pico cromatográfico puro deve ser o mesmo desde o início até o fim do pico para cada espectro gravado sobre ele. Ao calcular o desvio padrão relativo do PPI sobre um pico, é possível obter uma medida do grau de pureza do pico. Por outro lado, o PPM descreve a semelhança entre duas curvas espectrais, calculada como a correlação entre os espectros do ápice do pico e os espectros das laterais do pico. O método fornece uma

medida de similaridade variando da identidade (= 1000) para espectros idênticos e (= 0) para espectros muito diferentes (WIBERG et al., 2004; BRYANT; KINGSWOOD; BELENGUER, 1996).

3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massa (CLAE-EM)

EM é o método mais sensível e seletivo para análise molecular e pode fornecer informações sobre a massa molecular, assim como sobre a estrutura da molécula. A combinação de cromatografia de alta eficiência com espectrometria de massas reúne as vantagens de um método de separação e um método de identificação. CLAE-EM é muito utilizado para análise de perfil químico de plantas medicinais *on-line* e é possível a desreplicação das amostras, ou seja, identificação dos picos cromatográficos sem a necessidade de isolamento (LIANG; XIE; CHAN, 2004).

Além disso, pode-se combinar os detectores de DAD e EM acoplados em série com a CLAE para obter perfis químicos de extratos vegetais e identificação das substâncias a partir de seus espectros no UV/Vis e massas (LIANG; XIE; CHAN, 2004). Inicialmente, procedimentos são usados para criar um banco de dados apropriado de tempos de retenção e espectros sob condições padronizadas. É importante também que os dados de bioatividade sejam já conferidos a certos compostos identificados, já no extrato bruto (BRADSHAW et al., 2001). Como exemplo, foi realizada a identificação de impurezas presentes em padrão comercial de teofilina foi feita em CLAE-EM por comparação do perfil de fragmentação das impurezas com um banco de dados (MA et al., 2009).

Ionização por elétron spray é uma técnica versátil, sensível e rápida para a determinação da pureza de pico quando acoplado ao CLAE. As impurezas podem ser rapidamente determinadas em níveis baixos, em que tanto a massa molecular quanto o tempo de retenção das impurezas podem ser detectadas e diferente dos detectores no UV (DAD), que substâncias com idênticos ou similares espectros no UV não pode ser distinguidos (BRYANT; KINGSWOOD; BELENGUER, 1996).

3.8. Análise elementar

Análise elementar é uma técnica utilizada para a determinação da composição elementar de compostos orgânicos e organo-metálicos, através da determinação da porcentagem de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre em uma amostra. Possibilita também avaliar a pureza destes compostos, podendo ser indicativa da presença de sais inorgânicos (KLUG et al., 1998).

3.9. Análise térmica

“Métodos térmicos são um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física da substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura enquanto a substância é submetida a uma variação de temperatura controlada e programada” (SKOOG apud MACKENZIE, 2002).

O amplo campo de aplicação dos métodos térmicos nas medidas das propriedades físicas, nos estudos das reações químicas e no comportamento térmico das amostras é de interesse acadêmico e industrial.

A termogravimetria (TG) é uma análise quantitativa e método comparativo capaz de produzir e reproduzir resultados rápidos. Pode ser usado no controle de qualidade de drogas, com a intenção de melhorar o produto final e para a determinação da qualidade e de parâmetros tecnológicos. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) pode ser utilizada na indústria farmacêutica como uma ferramenta analítica de importância para testes de identificação e determinação da pureza de drogas ativas além de ser um método padrão para caracterização de drogas sólidas, em particular no estudo de formulação, pois há o aparecimento e desaparecimento de pico endotérmicos e exotérmicos ocasionados pela diferença de excipientes utilizados na formulação (CESCHEL et al., 2003).

As técnicas térmicas estão fornecendo importante contribuição para a química de produtos naturais com suas aplicações em plantas medicinais utilizadas tradicionalmente pela cultura popular. Estudos foram realizados com alcalóides de *Cissampelos sympodialis*, em que a molécula warifiteína foi caracterizada por TG e DSC (ARAGÃO, FILHO; MACÊDO, 2001).

Macêdo et al. (2000) utilizaram as técnicas de TG e DSC para estudar o comportamento térmico, pureza e estabilidade de antidepressivos e Ma et al. (2009) para a determinação de constituintes voláteis e da pureza de padrão comercial de teofilina. Os resultados obtidos revelaram a importância do uso dos métodos térmicos para o controle de drogas bioativas. O uso de técnicas limpas, rápidas e simples para obter os resultados é a razão do importante crescimento das análises térmicas no controle de qualidade de ingredientes ativos em medicamentos.

3.10. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa

CLAE preparativa é uma técnica versátil, robusta e amplamente utilizada para o isolamento de produtos naturais. A principal diferença entre CLAE e outros modos de cromatografia em coluna é que o diâmetro da partícula da fase estacionária é comparativamente baixo (3–10 μm), e essas partículas são empacotadas de forma a resultar em uma estrutura uniforme dentro da coluna, o leito cromatográfico. Quanto menor for o diâmetro das partículas maior será a pressão necessária para conduzir o solvente através das camadas (CANNELL, 1998).

A CLAE preparativa é muito utilizada na purificação de compostos de amostras complexas, tais como de matrizes biológicas e produtos naturais (ZHANG et al., 2009). A principal vantagem da cromatografia preparativa decorre da capacidade de desenvolver e executar rapidamente uma purificação, além de ser uma excelente ferramenta para purificação de isômeros (CHRISTOPHER et al., 2009).

Quando grandes quantidades de substâncias purificadas são necessárias, estas podem ser obtidas pela injeção de grandes quantidades de amostras e/ou por injeções repetitivas (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997), dependendo da qualidade da separação e das dimensões das colunas cromatográficas disponíveis.

Absorção de um composto pela fase estacionária pode ser aproximada às isotermas de Langmuir. Em pequenas concentrações da amostra na fase móvel, a absorção do analito pela coluna é proporcional à concentração deste na fase móvel, sendo observado um comportamento linear. Em altas concentrações do analito na fase móvel o comportamento linear da isoterma não é mais observado, ocorrendo a deformação do pico cromatográfico, mudança na retenção e perda de resolução (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; KNOX; PYPPE, 1986).

A otimização das condições de separação é difícil e uma tarefa fundamental para assegurar a pureza e a eficiência do processo. No desenvolvimento de método para um sistema complexo, a otimização das condições de separação é geralmente realizado em nível analítico por tentativa e erro, para economizar amostra e solvente, e depois as condições otimizadas são aplicadas no modo preparativo pelo aumento de escala (escalonamento) (JIN et al., 2008).

A cromatografia preparativa desempenha um papel fundamental na medicina tradicional chinesa, devido ao grande desempenho para a separação de amostras complexas (JIN et al., 2008), tornando-se importante também para a os produtos naturais encontrados no Brasil, já que estes tem um papel importante para o desenvolvimento desta área.

A utilização da CLAE preparativa em fase reversa C-18 é amplamente utilizada na separação de compostos de plantas medicinais. Alguns exemplos recentes do uso de CLAE preparativa na purificação de produtos naturais são apresentados a seguir. Liu et al. (2007) purificaram ginsenosídeos de extratos de folhas de *Panax notoginseng* utilizando ELSD (detector de espalhamento de luz evaporativo) como detector. Zhang et al. (2008) isolaram 4 flavonas C-glicosiladas de folhas de bambu (*Phyllostachys nigra var. henonis*). Zhou et al. (2007) obtiveram iridóides glicosilados de *Gardenia jasminoides* Ellis. Wu, Lohse e Grendlatt (1995) utilizaram a metodologia de saturação da fase estacionária da coluna para o isolamento de taxol de *Taxus canadensis* tanto em fase normal quanto em fase reversa.

Uma alternativa adicional para a purificação de metabólitos secundários de plantas por CLAE é o uso do modo reciclante, utilizado na purificação final quando não se tem uma separação desejada entre duas substâncias de difícil resolução, com a vantagem de ter baixo consumo de solvente. Taketa et al. (2004) e Lee, Jin e Row (2006) utilizaram este processo de separação no isolamento de substâncias naturais, como a eupatilina de *Artemisia princeps* PAMPAN e *nor-secofridelanos* de *Galphimia glauca*, respectivamente.

3.11. *Casearia sylvestris*

Dentre as espécies de plantas com conhecida propriedade farmacológica está *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae), uma planta nativa do Brasil, Peru, Argentina, Uruguai e Bolívia; encontrada também no México, Antilhas e em outras partes de América Latina. Conhecida popularmente no Brasil como guaçatonga, um termo nativo originado da língua

tupi-guarani, indicativo do uso antigo dessas espécies pelas comunidades indígenas brasileiras (ESTEVES et al., 2005).

No portal do Ministério da Saúde está disponível a relação nacional das 71 plantas medicinais de interesse do SUS, divulgada em fevereiro de 2009. Nesta relação estão plantas medicinais nacionais que apresentam potencial para gerar produtos e entre elas encontra-se a *C. sylvestris*. Esta lista tem como finalidade a orientação de estudos dessas plantas para geração de produtos a serem utilizados pela população (BRASIL, 2009b).

As folhas de *C. sylvestris* são utilizadas tradicionalmente como um agente anti-séptico, cicatrizante e como anestésico tópico, e são estudadas extensamente pela suas propriedades antiúlcera e antitumoral. Os extratos aquosos das folhas tem a capacidade de neutralização de venenos de serpentes e de abelhas (YAMASHITA et al., 2005), além de atividade antiplasmodial no tratamento de malária (MESQUITA et al., 2007).

Devido à grande utilização de *C. sylvestris*, estudos foram realizados com o objetivo de caracterizar quimicamente os princípios ativos responsáveis pelas várias ações terapêuticas atribuídas a esta planta. Entre estes estudos estão incluídos a análise de variabilidade intra-específica de casearinas (SANTOS, 2001), além da investigação de constituintes ativos antiulcerogênicos e antitumoral (SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2010), desenvolvimento de metodologia de extração para obtenção de frações com alto potencial farmacológico (FUNDAÇÃO..., 2005) e metodologia de extração para obtenção de fração enriquecida em casearinas (TININIS, 2006).

O gênero *Casearia* tem se caracterizado pela ocorrência de substâncias de interesse, como cumarinas, flavonóides, lignanas, e diversos diterpenos, especialmente os clerodânicos, sendo estes últimos diretamente relacionados às atividades antiulcerogênica, citotóxica e antiinflamatória apresentada pelos extratos dessas plantas. Quanto à constituição de óleos essenciais de folhas de *C. sylvestris* há apenas relato descrevendo a presença de biciclogermacreno, germacreno-D, germacreno-B, β -cariofileno, δ -elemeno como componentes principais (SILVA et al., 2008; TININIS et al., 2006; ESTEVES et al., 2005).

3.11.1. Extrato Etanólico das Folhas de *Casearia sylvestris*

A atividade antigástrica do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* foi estudada por Basile et al. (1990). O extrato foi efetivo na redução da produção de suco gástrico quando administrado por via oral em ratos em relação à droga controle. Não apresentou redução da produção de ácido clorídrico, o pH do suco gástrico não foi significativamente diferente dos

apresentados pelos controle e o extrato apresentou baixa toxicidade (BASILE et al., 1990). Sua ação farmacológica, de acordo com os autores, pode ser atribuída a óleos voláteis, taninos e aos triterpenos das folhas (SERTIÉ; CARVALHO; PANIZZA, 2000).

A identificação dos princípios ativos responsável pelo efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas foi realizado por Santos (2008), que isolou diversos diterpenos clerodânicos, entre eles as casearinas B, D, O, X e a caseargrewiina F, que apresentaram inibição total da formação de úlceras induzidas por etanol em ratos (SANTOS, 2008). Estas substâncias também apresentaram atividades citotóxicas importantes em várias linhagens de células tumorais humanas (SANTOS et al., 2010).

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas foi estudada frente a três leveduras, dois fungos filamentosos, seis bactérias Gram-negativas, e duas Gram-positivas, apresentando resultados satisfatórios para estes testes. Foram identificados dois compostos derivados do ácido gálico (3,5-dimetiléter do galato de isobutila e 3,5-dimetiléter do galato de metila) como responsáveis por essa atividade (SILVA et al., 2008).

Estudos da atividade genotóxica e mutagênica do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* e de algumas casearinas obtidas desses extratos indicaram que baixas dosagens possuem ação protetora contra danos ao DNA, mas para altas dosagens foram observados efeitos potencialmente mutagênico (MAISTRO; CARVALHO; MANTOVANI, 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

3.11.2. Extrato metanólico e aquoso das folhas de *Casearia sylvestris*

Os estudos com extrato aquoso das folhas relataram a capacidade desse extrato em inibir a ação de enzimas, entre elas a fosfolipase A2 (PLA2) responsáveis por algumas das propriedades biológicas dos venenos de serpentes (BORGES et al., 2000, 2001).

Francischinelli et al. (2008) estudaram diferentes tipos de extrato das folhas de *C. sylvestris*, como o hexânico, diclometânico, acetato de etila e metanólico na neutralização dos efeitos tóxicos do veneno de *Bothrops jararacussu*. O extrato metanólico mostrou-se ativo, sendo que os componentes fenólicos foram relacionados a este efeito. Foi sugerido como substância candidata a princípio ativo a rutina, atuando em sinergismo com outros elementos não identificados até o devido momento.

Sugere-se que as folhas de *C. sylvestris* possuem princípios bioativos, sob a forma de fitocomplexo que pode vir a ser usado como um antídoto contra efeitos neurotóxicos,

antibotrópico e miotóxico (FRANCISCHINELLI et al., 2008). Um aspecto importante a ser considerado em relação aos princípios bioativos de folhas de guaçatonga está relacionado à ausência de efeitos genotóxicos (MAISTRO et al., 2004). Isso representa um incentivo para que estudos experimentais *in vivo* utilizando o extrato metanólico de *C. sylvestris* após a injeção intramuscular de veneno de cobra, simulando assim envenenamento (FRANCISCHINELLI et al., 2008).

3.11.3. Óleo essencial

Esteves et al. (2005) estudaram as atividades antiinflamatória e antiúlcera gástrica dos óleos essenciais das folhas dos *Casearia sylvestris*, devido a sua grande aplicabilidade para o tratamento de lesões de pele, úlceras gástricas e processos inflamatórios. Como resultado, os autores sugerem que os óleos essenciais das folhas da guaçatonga apresentam atividade antiinflamatória e antiúlcera. Além disso, atribuem aos compostos terpênicos essas atividades, sendo que o biciclogermacreno (sesquiterpeno) constitui 40,9% do óleo essencial extraído.

A avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *C. sylvestris* contra células tumorais (A-549, HeLa e HT-29) foi estudado por Silva et al. (2008) a fim de contribuir para a utilização segura desta planta como fitofármaco. O óleo essencial desta planta é rico em β -cariofileno (18,1%) e α -humuleno (4,7%). Neste estudo foram comparados os resultados de citotoxicidade obtidos com o óleo essencial e com padrões dos dois sesquiterpenos citados acima, responsáveis por 22,8% da constituição do óleo essencial. Os resultados obtidos foram semelhantes. Esses resultados apresentam-se positivos para o uso contra diferentes tipos de câncer uma vez que o óleo essencial das folhas apresenta baixa citotoxicidade contra células não tumorais (SILVA et al., 2008).

Tininis et al. (2006) estudaram a composição do óleo essencial de folhas de uma população de *C. sylvestris*. As coletas das folhas ocorreram em dois períodos, manhã e a tarde, e foi verificada uma pequena variação intra-específica entre a população e esta foi dividida em dois grupos após análise dos dados por análise hierárquica de agrupamento e por análise dos componentes principais. No período da manhã, os constituintes principais foram identificados como: longifoleno (1,8%), β -selineno (4,2%), germacreno-D (79,2%) e germacreno-B (14,8%). À tarde, foram identificados: longifoleno (3,2%), β -gurgeneno (1,1%), γ -muruleno (3,0%), γ -gurjeneno (2,2%), β -selineno (5,2%), germacreno-D (66,2%), biciclogermacreno (3,6%), δ -cadineno (1,7%) e germacreno-B (13,7%).

Como pode-se observar existem alguns resultados diferentes entre esses autores quanto à composição química do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*. Esteves et al. (2005) relataram a composição de 40,9% correspondente ao biciclogremacreno como sendo o maior constituinte e Silva et al. (2008) apresentaram resultados da composição com 18,1% para β -cariofileno e 4,7% para o α -humuleno. Tininis et al. (2006) relataram a formação do biciclogremacreno como sendo um produto derivado do rearranjo ocorrido fotoquimicamente do germacreno-B ou germacreno-D, que estão presente em maior quantidade, e nem cita a presença de β -cariofileno e α -humuleno relatados por Silva et al. (2008). Desta forma, para chegar a uma conclusão a respeito da constituição química e os resultados dos testes biológicos do óleo essencial de *C. sylvestris* deve-se utilizar uma quantidade suficiente de indivíduos, ou seja, representativos da população, obtidos em diferentes locais e épocas do ano para a realização desses estudos.

3.11.4. Diterpenos Clerodânicos

Um grande número de estudos fitoquímico com espécies de *Casearia* tem mostrado a ocorrência dos diterpenos clerodânicos tricíclicos altamente oxigenados nesse gênero, todos exibindo configuração *cis* entre os anéis A e B e um característico sistema tetraidrofurano diacetálico no anel C, além de grupos hidroxila ou éster como substituintes nas posições C-2, C-6, C-7, C-18 e C-19 (Figura 1). *Casearia sylvestris* apresenta muito desses compostos, denominados de casearinas (SANTOS et al., 2007; SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2010).

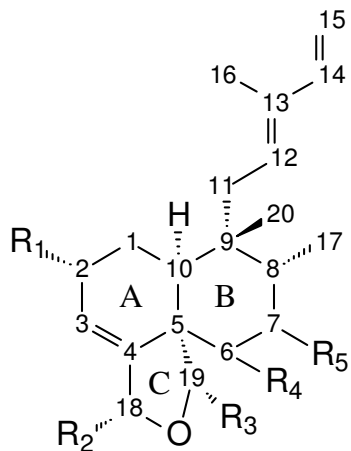


Figura 1. Representação do esqueleto carbônico das casearinas.

Às casearinas (Tabela 1) são atribuídas algumas atividades farmacológicas, das quais podem ser destacadas as ações antitumoral, tripanocida, antiúlcera, citotóxica e

quimioprotetora (ITOKAWA et al., 1988; ITOKAWA et al., 1990; DE CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002; SPINDOLA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2010). A tabela 2 apresenta algumas características físicas dessas casearinas.

O isolamento desses diterpenos clerodânicos foram realizados utilizando-se diferentes metodologias, partindo-se do extrato etanólico (ITOKAWA et al., 1988; MORITA et al., 1991; OBERLIES et al., 2002; SANTOS, 2008; TININIS, 2006; OLIVEIRA et al. 2009; SANTOS et al., 2010) ou do extrato diclorometânico/metanólico (2:1) (CARVALHO et al., 1998) das folhas.

A partir da fase hexânica do extrato etanólico, por fracionamento em coluna de sílica gel e de C-18, foram isoladas as casearinas de A-R (ITOKAWA et al., 1988; MORITA et al., 1991). As casearinas S e T foram obtidas da fase diclorometânica do extrato diclorometânico/metanólico (2:1), depois de fracionamento em sílica gel (CARVALHO et al., 1998). A casearina X [antes conhecida no grupo como casearina U (SANTOS, 2001; TININIS, 2006; SANTOS, 2008), o nome foi alterado devido a uma publicação de uma molécula diferente com o nome de casearina U], foi isolada também da fase hexânica seguida de fracionamento em sílica gel e purificação em CLAE C18 preparativa (SANTOS, 2001). Tininis (2006) isolou as caseargrewiina F e as casearinas X e Y (dados não publicados) a partir da fração hexânica, após extração em fase sólida em Si/carvão ativo (1:1), CC em C-18 e CLAE fenil preparativa.

Nenhum relato é verificado na literatura quanto ao desenvolvimento de método em CLAE preparativa para o isolamento dessa classe de substância. Tininis (2006) desenvolveu um método para obtenção de fração enriquecida em casearinas e, com esse resultado, Santos (2008) desenvolveu uma condição de fracionamento dessa fração em coluna aberta de vidro, utilizando sílica gel como fase estacionária e fase móvel composta de misturas de hexano, acetato de etila e isopropanol eluída em gradiente.

Assim, essa classe de substância (diterpenos clerodânicos), em especial as casearinas obtidas de *C. sylvestris*, são candidatas potenciais a marcadores químicos para uso no controle de qualidade de fitoterápico ou fitofármacos preparados a partir dessa espécie vegetal, já que esta planta tem aplicações muito antigas na comunidade e muitas das atividades biológicas são associadas aos diterpenos clerodânicos.

Tabela 1. Casearinas e similares isoladas de *Casearia sylvestris*.

Casearina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A	α -OMe	OAc	OAc	α -OH	OBu
B	α -OMe	OAc	OAc	α -OAc	OBu
C	α -OH	OAc	OAc	α -OAc	ODc
D	α -OH	OBu	OAc	α -OH	OBu
E	α -OH	OEt	OAc	α -OH	ODc
F	α -OH	OEt	OAc	α -OH	OBu
G	α -OMe	OAc	OAc	H	OBu
H	α -OH	OAc	OAc	H	OBu
I	α -OH	OAc	OBu	H	OBu
J	α -OMe	OBu	OAc	α -OH	OBu
K	α -OAc	OAc	OAc	α -OH	OBu
L	α -OMe	OBu	OAc	α -OAc	OH
M	α -OH	OBu	OBu	α -OAc	OH
N	α -OMe	OAc	OBu	α -OAc	OBu
O	α -OMe	OBu	OAc	α -OAc	OBu
P	α -OMe	OAc	OAc	α -OAc	OAc
Q	α -OH	OAc	OAc	α -OAc	OBu
R	=O	OAc	OAc	α -OH	OBu
S	α -OMe	=O	OAc	H	OBu
T	α -OMe	OAc	OAc	β -OAc	OBu
X (U)	α -OBu	OBu	OAc	α -OH	H
X	α -OBu	OAc	OAc	H	OBu
Y	α -OMe	OAc	OBu	H	OBu
Caseargrewiina F	α -OBu	OAc	OAc	OH	H
Casearvestrina					
A	β -isoOBu	OAc	OAc	α -OH	H
B	β -OMeBu	OAc	OAc	α -OH	H
C	β -OHex	OAc	OAc	α -OH	H

Tabela 2. Características físicas das casearinas obtidas de *C. sylvestris*.

Casearina	Aspecto	Ponto de Fusão (°C)	Formula Molecular	Autor
A	Incolor	82,0 – 83,0	C ₂₉ H ₄₂ O ₉	Itokawa et al. (1990)
B	Incolor	80,0 – 81,0	C ₃₁ H ₄₄ O ₁₀	Itokawa et al. (1990)
C	Oleosa	-	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₀	Itokawa et al. (1990)
D	Pó branco	140,0 – 141,0	C ₃₀ H ₄₄ O ₉	Itokawa et al. (1990)
E	Pó branco	158,0 – 160	C ₃₄ H ₅₄ O ₈	Itokawa et al. (1990)
F	Pó branco	150,0 – 151,0	C ₂₈ H ₄₂ O ₉	Itokawa et al. (1990)
G	Oleosa	-	C ₂₉ H ₄₂ O ₈	Morita et al (1991)
H	Oleosa	-	C ₂₈ H ₄₀ O ₈	Morita et al. (1991)
I	Oleosa	-	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	Morita et al. (1991)
J	Oleosa	-	C ₃₁ H ₄₆ O ₉	Morita et al. (1991)
K	Oleosa	-	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₀	Morita et al. (1991)
L	Oleosa	-	C ₂₉ H ₄₂ O ₉	Morita et al. (1991)
M	Oleosa	-	C ₃₀ H ₄₄ O ₉	Morita et al. (1991)
N	Oleosa	-	C ₃₃ H ₄₈ O ₁₀	Morita et al. (1991)
O	Oleosa	-	C ₃₃ H ₄₈ O ₁₀	Morita et al. (1991)
P	Oleosa	-	C ₂₉ H ₄₀ O ₁₀	Morita et al. (1991)
Q	Oleosa	-	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₀	Morita et al. (1991)
R	Oleosa	-	C ₂₆ H ₃₄ O ₉	Morita et al. (1991)
S	Oleosa	-	C ₂₇ H ₃₈ O ₇	Carvalho et al. (1998)
T	Oleosa	-	C ₃₁ H ₄₄ O ₂	Carvalho et al. (1998)
X (U)	Pó branco	-	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	Santos (2001)
X	Óleo amarelo	-	C ₃₂ H ₄₆ O ₉	Tininis (2006)
Y	Óleo amarelo	-	C ₃₁ H ₄₆ O ₈	Tininis (2006)
Caseargrewiina F	Solido amorfo	-	C ₂₈ H ₄₀ O ₈	Kanokmedhakul; Kanokmedhakul; Buayairaksa (2007)

4. Materiais

Balança Analítica: Mettler Toledo modelo AG245 (máx. 210 g; d=0,1 mg).

Balança semi-analítica: Gehaka[®], modelo BG2000 (máx. 2.020 g; min. 0,5 g; d=0,01 g).

Colunas cromatográficas de bancada:

- coluna de vidro com 2,5 cm d.i. e 4,0 cm de comprimento, com saída para sistema de sucção (“vácuo”);
- coluna de vidro com 7,5 cm d.i. e 20,0 cm de comprimento

Colunas cromatográficas CLAE:

- Phenomenex[®] Luna C-18. 250 x 4,6 mm, 5 µm.
- Phenomenex[®] Luna Fenil-Hexil. 250 x 4,6 mm, 5 µm.
- Shim-pack CLC ODS (M). 250 x 4,6 mm, 5 µm.
- Phenomenex[®] Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10 µm.
- Phenomenex[®] Gemini C-18. 250 x 21,2 mm, 5 µm.

Pré-tratamento das amostras: Agilent Technologies cartucho de C18 (Accu Bond^{II} SPE ODS-18 Cartridges).

Placas para CCD: SORBENT Technologies Sílica G TLC plates w/UV 254, suporte de alumínio (20 x 20 cm x 0,2 mm).

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE 1) (Varian[®], modo analítico): bomba ProStar[®] 240, detector de arranjo de diodos ProStar[®] 330, injetor automático ProStar[®] 410, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados *Star Chromatography Workstation*[®].

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE 2) (Varian[®], modo analítico): bomba ProStar[®] 230, detector de UV/Vis ProSta[®] r 310, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Star Integrator[®].

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE 3) (Shimadzu[®], modos analítico e preparativo): bomba LC-18 A, com sistema de controle SCL-10Avp, detector UV/Vis (2

comprimentos de onda simultâneos) SPD-M10Avp, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Class-VP versão 6.1.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE 4) (Shimadzu[®], modo analítico): bomba LC-20AT, com sistema de controle CBM-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, injetor automático SIL-20A, forno para coluna CTO-20A, degaseificador DGU-20A-5, programa gerenciador do cromatógrafo e dados LC-solution versão 1,21

CLAE-EM: CLAE Simadzu[®], bomba LC-20AD, detector de DAD SPD-M20A, sistema de controle CBM-20A, degaseificador DGU-20A-5, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados LC solution. **Espectrômetro de Massas** Bruker Daltonics Billerica, MA, EUA, ultrOTOF_Q - ESI-TOF Mass Spectrometer, detecção no modo positivo, calibração interna e externa com Na-TFA, Bomba de Infusão, Fluxo 300µl/h.

Análise elementar: Analisador CHNS-O modelo EA 1108 (Fisons Instruments)

Espectrômetros de ressonância magnética nuclear:

- Espectrômetro Varian[®] INOVA 11,4 T operando a 500 MHz para ¹H e a 125 MHz para ¹³C.
- Espectrômetro Varian INOVA 7,04 T operando em 300 MHz ¹H e em 75 MHz para ¹³C

Estufa de secagem de material de laboratório: Marconi[®] modelo MA 033/3.

Ultrassom: ELMA[®], modelo TANSSONIC 700, frequência: 35 kHz.

Fase estacionária para cromatografia em coluna:

- a) **sílica gel:** 0,060-0,200 mm; diâmetro do poro: 6 nm; marca: Acros Organics[®] Bélgica (reembalado por Ultra Chem[®] Ind. e Com. de Prod. Químicos Ltda; 0,035-0,070 mm; diâmetro do poro: 6 nm; marca: Acros Organics[®] Bélgica (reembalado por Ultra Chem[®] Ind. e Com. de Prod. Químicos Ltda.
- b) **carvão ativo em pó:** LABSYNTH[®] Produtos para laboratórios Ltda;
- c) **sílica C-18:** 0,040-0,060 mm; marca: LiChroprep[®] RP-18 (Merck[®])

Rota Evaporador: Büchi® modelo R-114 RE, com banho termostatizado (aquecimento) Büchi® modelo B-480, banho ultratermostatizado (refrigeração) Marconi® modelo MA184 e sistema de “vácuo” Büchi® modelo V-500 com condensador secundário.

Solventes:

- a) **CCDC, CC, EFS:** solventes grau P.A., adquiridos no mercado e destilados no Instituto de Química da UNESP, em destiladores de vidro;
- b) **Análise por CLAE** (incluindo pré-tratamento da amostra): solventes grau cromatográfico;
- c) **Água:** tratamento por osmose reversa e ultra purificada em purificador Milli-Q.

Material Vegetal: Foi utilizado o material vegetal disponível do trabalho de Santos (2008) e este realizou a coleta no seguinte local:

- a) Parque Estadual “Carlos Botelho” em São Miguel Arcanjo-SP: 13/03/2004, período da tarde: AGS04 (S 24°03'28'', O 47°58'53''), AGS05 (S 24°03'28'', O 47°58'53'').

5. Métodos

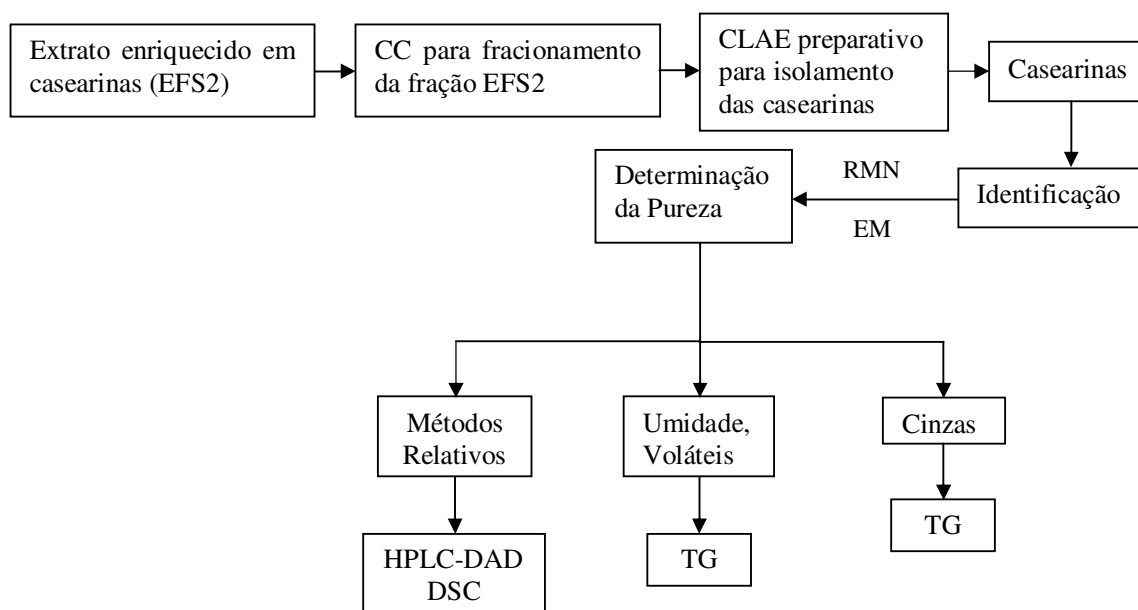
5.1. Metodologia para purificação das casearinas e análise de pureza

O extrato enriquecido em casearinas (EFS2) obtidos a partir do trabalho de Santos (2008) por extração em fase sólida foi fracionado em coluna aberta de vidro de sílica gel. Após este fracionamento, foi feito o desenvolvimento de método cromatográfico no modo analítico com posterior escalonamento para o preparativo, sendo os esses otimizados no modo isocrático e reciclante.

As casearinas isoladas foram submetidas à identificação por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. Após a identificação, foi realizada a investigada a determinação da pureza por CLAE-DAD, pelo método de normalização de área, e DSC pela aplicação da lei de Van't Hoff. A determinação do teor de umidade, componentes orgânicos voláteis e cinzas foram feitas por TG.

Assim, a pureza foi calculada levando em consideração todos esses fatores a partir da equação (MA et al., 2009):

$$\text{Pureza (\%)} = \text{Pureza relativa (\%)} - \text{Impurezas Voláteis (\%)} - \text{Teor de Água (\%)} - \text{Cinzas (\%)}$$



5.2. Cromatografia em coluna

O extrato etanólico das folhas (462,6 g) adsorvido em mistura de sílica e carvão ativo (1:1 m/m) foi submetido à extração em fase sólida (EFS). A fase estacionária (FE) foi composta de uma mistura de sílica gel (60-200 μm , 2,6 kg) e carvão ativo em pó na proporção de 1:1 (m/m), empacotada em uma coluna de vidro de 20 x 19 cm e eluída com 6,0 L de Hex/AcOEt 95:5 (v/v) (F1), 6,0 L de AcOEt (F2 ou EFS-2) e 12,0 L de MeOH (F3) (TININIS, 2006). A fração EFS-2, enriquecida em casearinas, obtida por este método de extração, já estava disponível no laboratório a partir do trabalho de Santos (2008).

Após a realização da extração em fase sólida seguiu-se com o subfracionamento da fração EFS-2 por cromatografia em coluna aberta de vidro, empacotada com sílica gel (CC-Si), utilizando as condições otimizadas por Santos (2008), que consistiu em aplicar 16,8 g da fração EFS-2 em coluna empacotada com sílica gel (20 x 7,5 cm; 35-70 μm ; poro: 6 nm; 470,0 g). A eluição foi realizada por gradiente em sete etapas em proporção volumétrica: **1.** Hex/AcOEt/IPA 85:14:1, **2.** 78:20,5:1,5, **3.** 76:22,4:1,6, **4.** 73:25,2:1,8, **5.** 68:29,9:2,1, **6.** 60:37,2:2,7, **7.** AcOEt/MeOH 1:1. O volume de FM utilizada para cada proporção de eluente foi de 1,8 L.

5.3. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As subfrações (FA) obtidas da CC-Si foram analisadas por CCDC com FM composta de Hex/AcOEt/IPA (60:36:4, v/v, 200,0 mL), placa de alumínio coberta com sílica gel G (20 x 10 cm x 0,2 mm) como FE e anisaldeído sulfúrico como revelador. Após comparação, as frações obtidas foram reunidas conforme perfil obtido (SANTOS, 2008).

5.4. Pré-tratamento das amostras para análise em CLAE-DAD

O procedimento para o pré-tratamento das subfrações FA para análise em CLAE-DAD analítico consistiu em pesar aproximadamente 10 mg de cada subfração, solubilização em 1,5 mL de MeOH/H₂O (98:2, v/v) e aplicação em cartucho de C-18, previamente ativado com MeOH puro. Em seguida, eluição da amostra com mais 3,0 mL de MeOH/H₂O 98:2 (v/v) e, por fim, mais 4,5 mL de MeOH para limpeza do cartucho para a próxima amostra, 3 amostras por cartucho. Após este procedimento, todas as subfrações eluídas com MeOH/H₂O 98:2

foram concentradas até eliminação total dos solventes e a seguir dissolvidas em 10 mL MeOH, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 1,0 mg/mL.

5.5. CLAE analítico

As análises das subfrações FA foram realizadas em CLAE-DAD (CLAE 1), no modo analítico, utilizando coluna de fase reversa C-18, eluição no modo gradiente linear iniciando com H₂O/MeOH/ACN 34:22:44 e finalizando com 00:47:53 em 42 minutos, mais 5 minutos isocrático na condição final, volume de injeção de 10 µL, vazão de 0,80 mL/min e detecção no UV (200-400 nm). Os cromatogramas foram registrados utilizando a leitura em 235 nm.

5.6. Desenvolvimento do método em CLAE preparativo e purificação

A estratégia utilizada para o desenvolvimento do método em CLAE-C18 preparativo incluiu inicialmente a otimização da resolução cromatográfica em modo isocrático, determinação dos valores máximos de carga (massa de amostra por injeção), volume de injeção em coluna analítica (250 x 4,6 mm, 5 µm) e vazão da fase móvel, com posterior escalonamento para coluna preparativa (250 x 22,1 mm, 10 µm). A força de eluição foi ajustada entre $k' = 7-20$ para o último pico, em modo isocrático e para a composição da FM foram avaliadas misturas binárias e ternárias de H₂O, MeOH e ACN.

As equações abaixo foram retiradas de Snyder; Kirkland; Glajch, 1997.

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

k' - fator de retenção

t_r - tempo de retenção do pico

t_m - tempo morto

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{r1} + t_{r2})}{(W_1 + W_2)}$$

R_s - resolução

t_{r1} - tempo de retenção do primeiro pico

t_{r2} - tempo de retenção do segundo pico

W_1 - largura do primeiro pico

W_2 - largura do segundo pico

O isolamento, realizado no equipamento CLAE 3, seguiu conforme os resultados obtidos a partir do desenvolvimento do método em CLAE analítico. Foi calculado o fator de

escalonamento (21,2) para transferência de escala analítica/preparativa. Este fator leva em consideração as dimensões das colunas analítica e preparativa.

$$X = (L \cdot D_{\text{col. prep}})^2 / (l \cdot d_{\text{col. anal}})^2 = (25 \cdot 21,2)^2 / (25 \cdot 0,46)^2 = 21,2$$

X – fator de escalonamento

L – comprimento da coluna preparativa;

D_{col. prep} – diâmetro da coluna preparativa;

l – comprimento da coluna analítica;

d_{col. anal} – diâmetro coluna analítica;

parâmetros a serem calculados a partir do fator de escalonamento

$$C_{\text{col. prep.}} = X \cdot C_{\text{col anal}}$$

$$V_{\text{inj col. prep.}} = X \cdot V_{\text{inj col anal}}$$

$$F_{\text{prep}} = X \cdot F_{\text{anal}}$$

$$t_{\text{prep}} = X \cdot \frac{F_{\text{prep}}}{F_{\text{anal}}} \cdot t_{\text{anal}}$$

C_{col. prep} – carga em coluna analítica

C_{col anal} – carga e coluna preparativa

V_{inj col. prep} – volume de injeção em coluna preparativa

V_{inj col anal} – volume de injeção em coluna analítica

F_{prep} – vazão da fase móvel em coluna preparativa

F_{anal} – vazão da fase móvel em coluna analítica

t_{prep} – tempo de retenção em coluna preparativa

t_{anal} – tempo de retenção em coluna analítica

Inicialmente, os picos majoritários foram coletados em coletor automático constituído de um conjunto de 63 tubos de ensaio (15 mL por tubo de ensaio). A análise por CLAE analítico (equipamento CLAE 1 e/ou 4) das frações recolhidas nos tubos de ensaio permitiu reuní-las de acordo com a pureza cromatográfica.

Para remover impurezas ainda presentes nas frações selecionadas da etapa anterior, uma etapa adicional de purificação foi utilizada. Para tal, foi otimizado um modo isocrático, sendo a FM constituída por H₂O/MeOH 20:80 (v/v), vazão de 17 mL/min, coluna preparativa (250 x 22 mm, 5 µm).

Também foi avaliado o modo reciclante para a purificação final das substâncias, utilizando FM composta de H₂O/MeOH 15:85 (v/v) e vazão de 16 mL/min, coluna preparativa (250 x 22 mm, 5 µm).

5.7. Identificação das casearinas

A identificação das casearinas isoladas foi realizada por RMN uni e bidimensional de ^1H e ^{13}C e gHMBC, gHMQC e gCOSY dissolvida em piridina- d_5 , além da utilização da espectrometria de massas para confirmação da massa molecular dissolvida em MeOH.

Também foi verificada a rotação ótica específica, $[\alpha]_D$, solubilizando a amostra em MeOH ou CHCl_3 .

5.8. Avaliação da pureza

A análise de pureza por CLAE-DAD das substâncias isoladas consistiu na utilização do equipamento CLAE 4 e de duas colunas cromatográficas com diferentes seletividades (C-18 e Fenil-Hexil), eluição da FM em gradiente linear composta de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ na proporção de 35:65 até 00:100 em 60 min, mais 10 min isocrático na condição final, vazão de 1 mL/min e detecção no UV (200-400 nm). Os cromatogramas foram registrados utilizando a leitura em 235 nm.

A técnica de CLAE-EM foi utilizada na tentativa de identificação das impurezas orgânicas presentes nas substâncias isoladas. A eluição da FM ocorreu em gradiente linear iniciando com $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 65:35 e finalizando em 00:100 em 15 min, mais 5 min na condição final. O espectrômetro de massas operou no modo positivo, ionização por ESI, nitrogênio como gás nebulizador.

As técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C foram utilizadas para a caracterização estrutural das substâncias e para avaliar a presença de sinais de impurezas.

As substâncias foram caracterizadas pelas curvas TG e DSC com razão de aquecimento de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ para a TG e de 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ e 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ para a DSC.

A composição percentual de C e H das substâncias isoladas foi determinada pela análise elementar.

6. Resultados e discussão

6.1. Cromatografia em coluna e CCDC

A partir da aplicação de 16,8 g da fração EFS-2 foram obtidas 50 subfrações, nomeadas FA, e essas foram analisadas por CCDC (Figura 2). Após análise das cromatoplas, as subfrações foram reunidas e novamente analisadas em CCDC (Figura 3). As distribuição de massas das 17 subfrações obtidas (Figura 4) e o rendimento da CC estão indicadas na Tabela 3. A CC apresentou alto rendimento (recuperação) após este processo de separação (99,6 %).

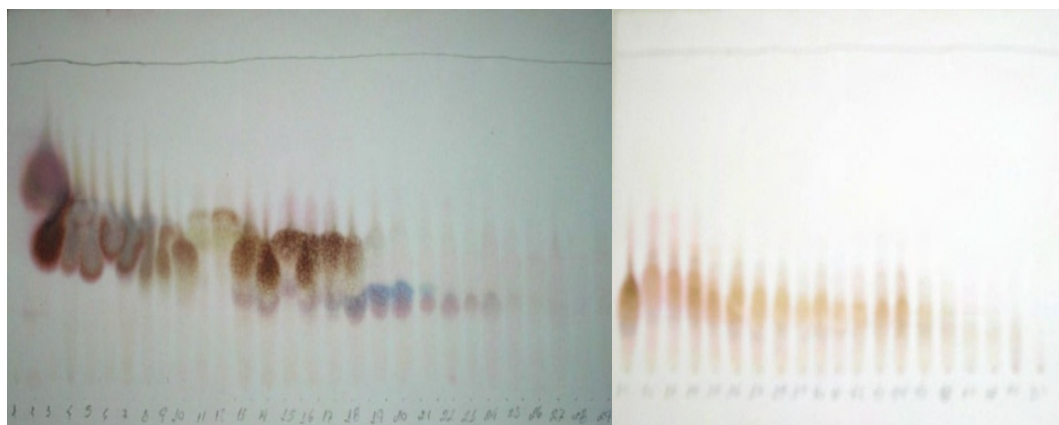


Figura 2. CCDC das 50 subfrações FA obtidas da CC-Si.

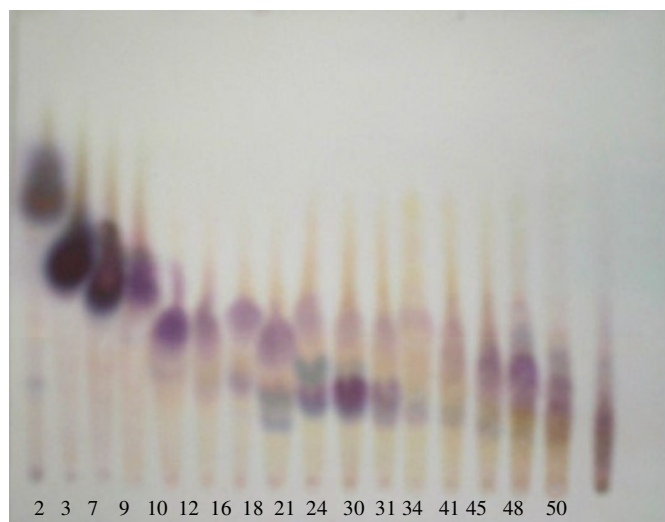


Figura 3. CCDC das 17 subfrações FA após reunião conforme Tabela 1.

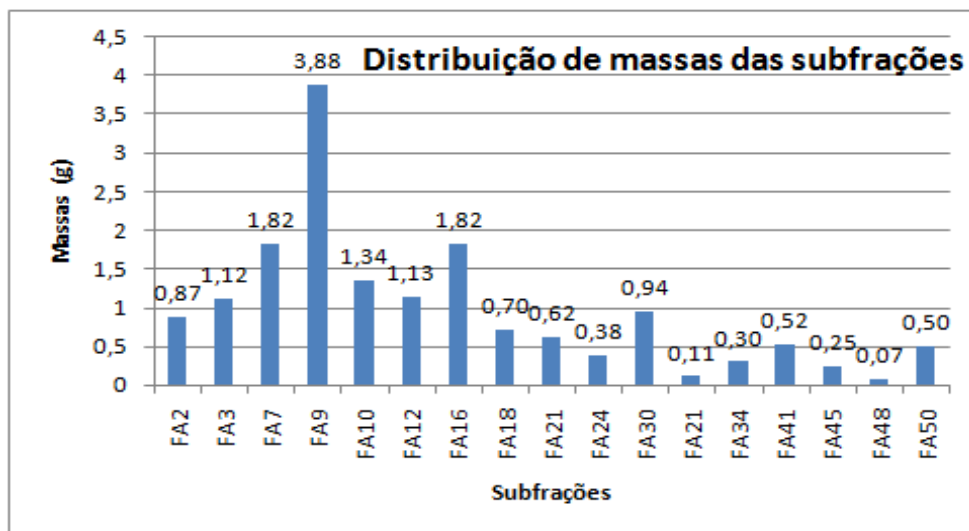


Figura 4. Diagrama de barras representando a distribuição de massas das 17 subfrações FA obtidas a partir da CC-Si.

Tabela 3. Identificação das subfrações, balanço de massa da CC-Si e rendimento em relação à 16,8 g da fração EFS-2.

Subfrações	Nome das Frações	Massa (g)	Rendimento da CC (%)
1 e 2	FA2	0,870	5
3	FA3	1,116	7
4,5,6 e 7	FA7	1,818	11
8 e 9	FA9	3,882	23
10	FA10	1,341	8
11 e 12	FA12	1,130	8
13, 14, 15 e 16	FA16	1,815	11
17 e 18	FA18	0,704	4
19, 20 e 21	FA21	0,616	4
22, 23 e 24	FA24	0,383	2
25, 26, 27, 28, 29 e 30	FA30	0,937	6
31	FA21	0,108	0,7
32, 33 e 34	FA34	0,297	2
35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41	FA41	0,523	3
42, 43, 44 e 45	FA45	0,246	1,5
46, 47 e 48	FA48	0,073	0,4
49 e 50	FA50	0,500	3
	Total	16,359	99,6

6.2. Pré-tratamento das subfrações e análise por CLAE-DAD analítico

Realizados os pré-tratamentos nas 17 subfrações FA conforme procedimento adotado, estas foram analisadas em CLAE-DAD no modo analítico para verificar o perfil químico de cada subfração, assim como a análise de uma amostra de caseargrewiina F isolada anteriormente por Santos (2008), utilizando coluna de fase reversa C-18, eluição no modo gradiente linear iniciando com H₂O/MeOH/ACN 34:22:44 e finalizando com 00:47:53 em 42 minutos, mais 5 min isocrático na condição final, vazão de 0,80 mL/min e detecção no UV (200-400 nm) e à 235 nm.

Os resultados do fracionamento da EFS-2 em CC-Si demonstram boa separação cromatográfica, fornecendo subfrações de composição simplificada, algumas constituídas principalmente por uma casearina já em alto grau de pureza, como as subfrações 16, 18, 21 e 24 (Figura 5), e praticamente todos os picos das subfrações obtidas apresentaram máximos de absorção no comprimento de onda de aproximadamente 235 nm, que é característico do dieno conjugado presente na cadeia lateral em C-9 das casearinas (CARVALHO et. al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2007).

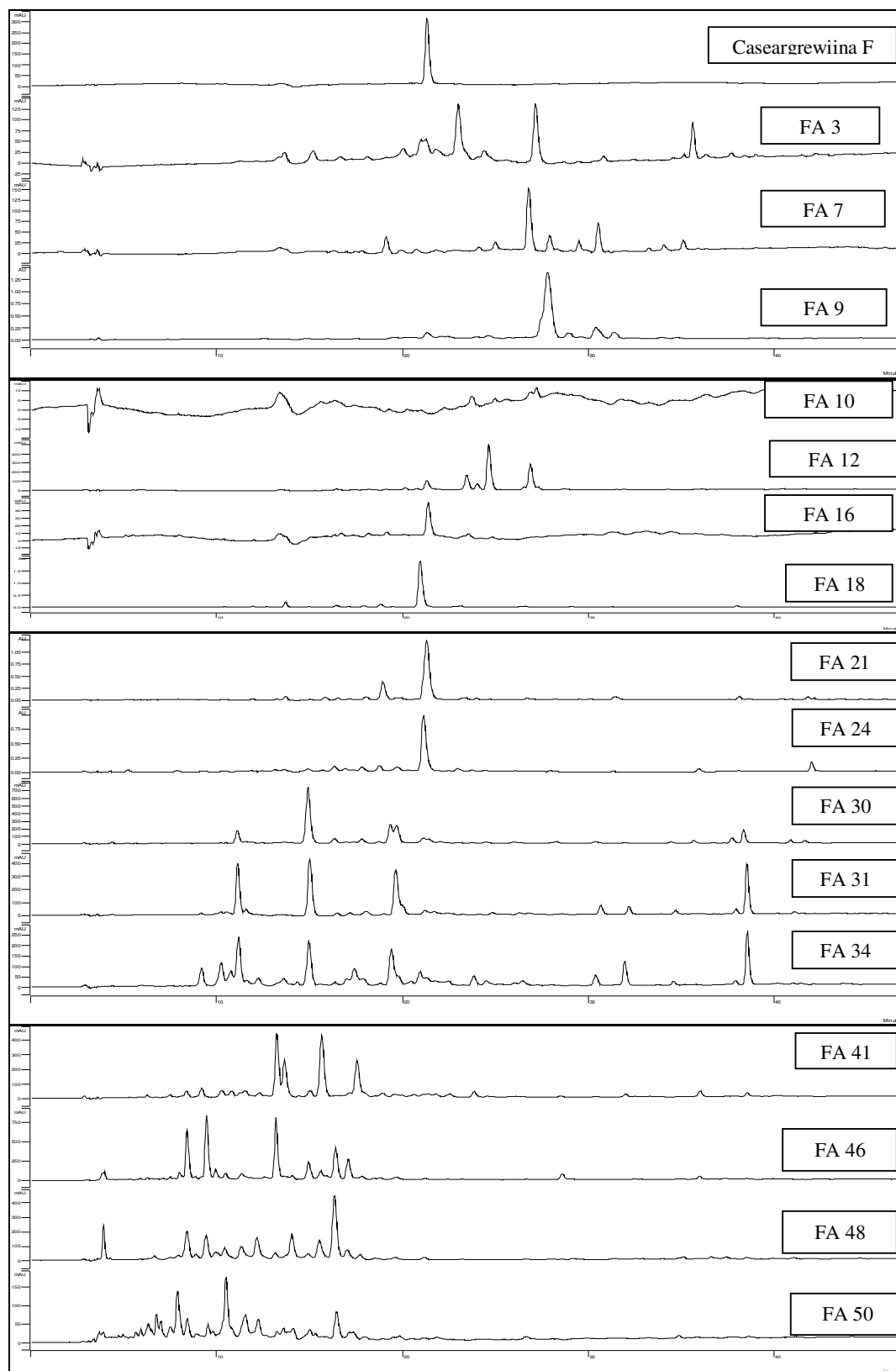


Figura 5. Cromatogramas das subfrações FA, obtidos em CLAE-DAD fase reversa C-18 e registrados em 235 nm.

A análise dos cromatogramas (Figura 5) evidencia a presença apenas de um pico mais intenso nas subfrações FA18, FA21 e FA24, indicando uma substância predominante, sendo necessária apenas uma simples purificação em CLAE no modo preparativo para obtê-las com alto grau de pureza. Além disso, os máximos de absorção no UV para estas três subfrações são 202 e 235 nm (Figura 6), e comparando o tempo de retenção com o da caseargrewiina F, pode-se sugerir que esta está presente nessas subfrações.

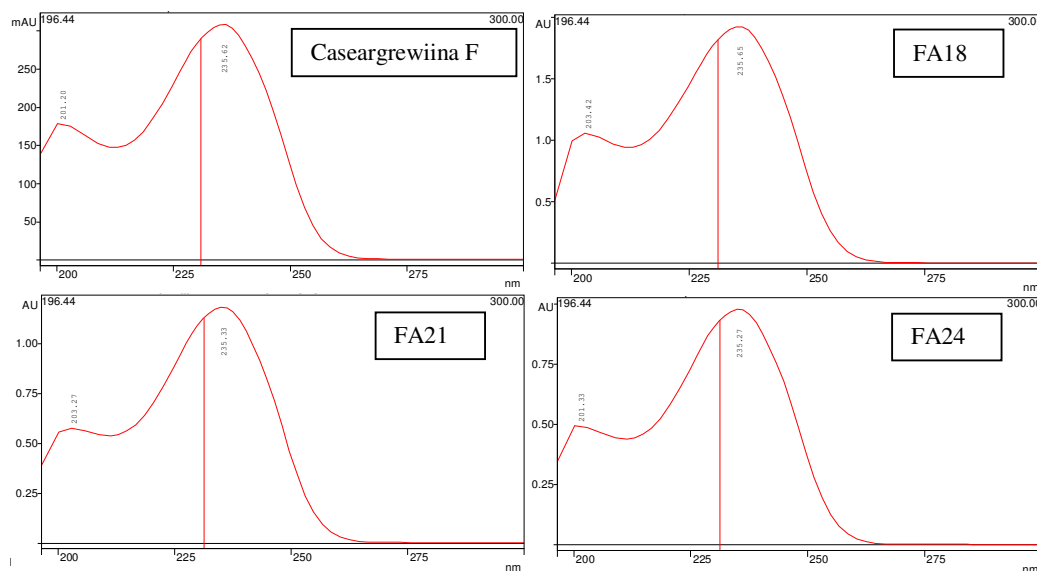


Figura 6. Espectro no UV de caseargrewiina F e das subfrações FA18, FA21 e FA24.

6.3. Desenvolvimento de método em CLAE preparativo

A próxima etapa realizada foi o desenvolvimento do método para o isolamento e purificação das casearinas em CLAE preparativo e a subfração 9 (FA9) foi escolhida para o desenvolvimento do método cromatográfico por possuir maior massa que as demais e por apresentar-se constituída exclusivamente por casearinas inclusive a casearina X, isolada por Santos (2008) desta subfração. Os resultados farmacológicos obtidos por Santos (2008) indicam que a casearina X é um dos princípios ativos com atividade antiulcerogênica presentes no extrato etanólico das folhas.

Seguindo a estratégia proposta para o desenvolvimento cromatográfico, foi ajustada a força de eluição da FM para k' entre 7-18 para o último pico com as misturas binárias e ternárias de H₂O/MeOH, H₂O/ACN e H₂O/MeOH/ACN no modo isocrático (Figuras 7, 8 e 9).

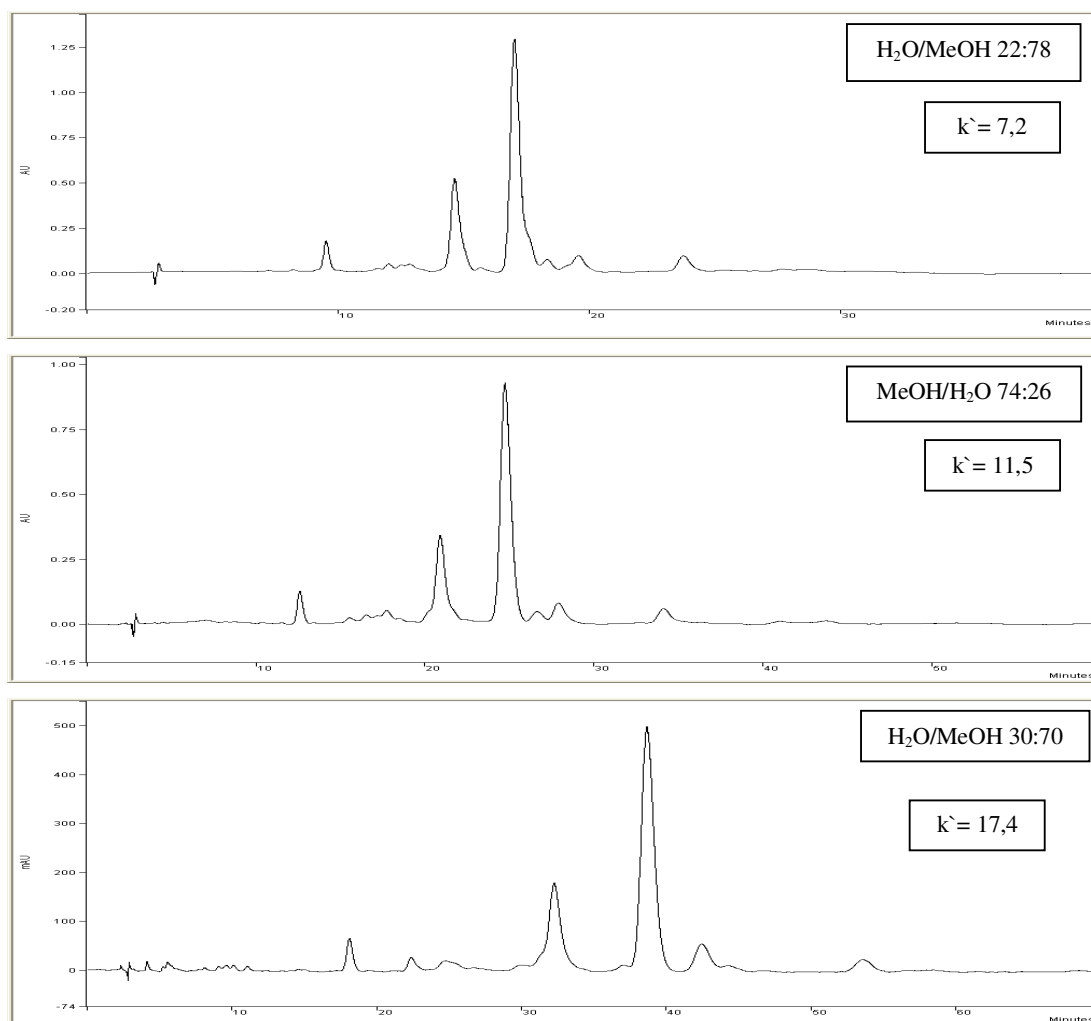


Figura 7. Cromatogramas do desenvolvimento cromatográfico para o ajuste da força de eluição da FM ($k' = 7 - 18$) em CLAE-UV da subfração FA9 com mistura binária H₂O/MeOH.

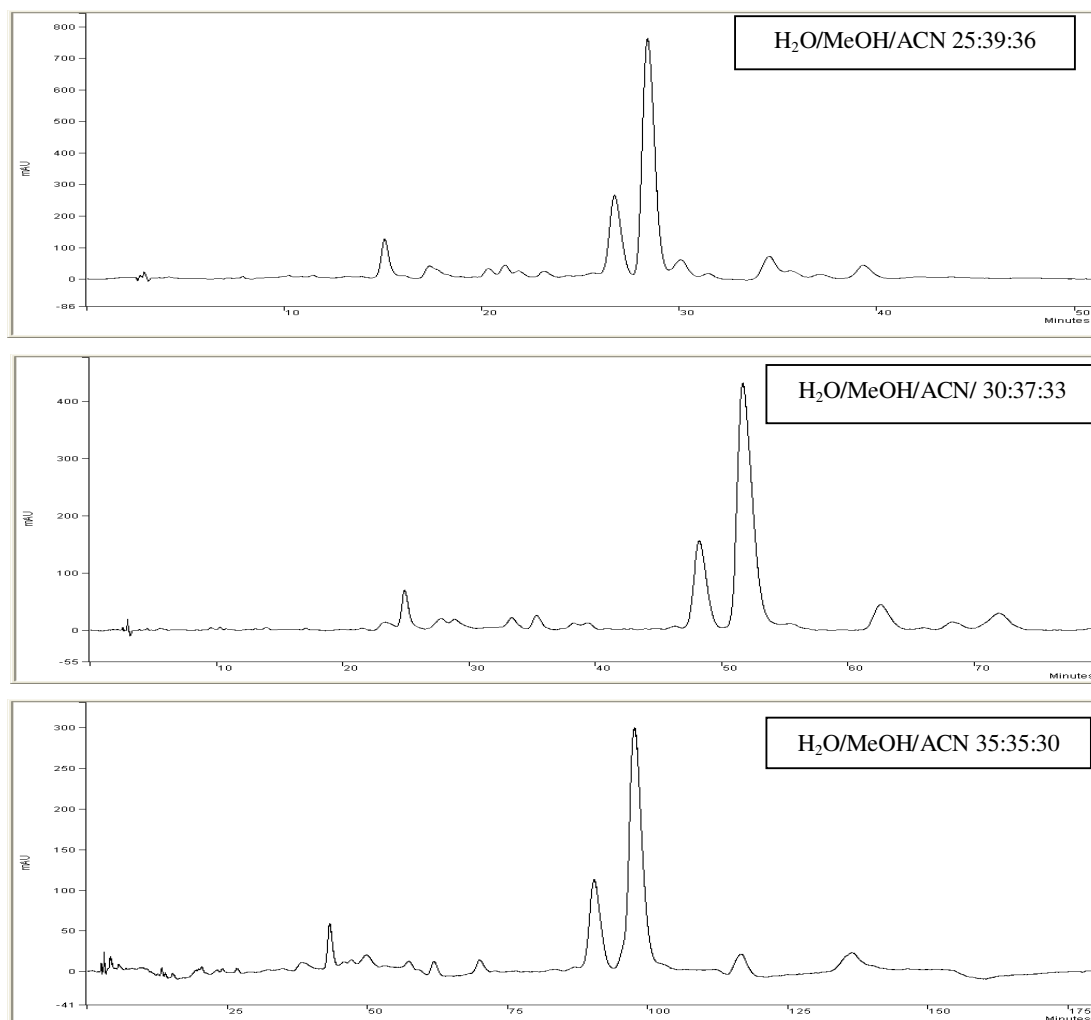


Figura 8. Cromatogramas do desenvolvimento cromatográfico para o ajuste da força de eluição da FM ($k' = 7 - 18$) em CLAE-UV da subfração FA9 com mistura ternária H₂O/MeOH/ACN.

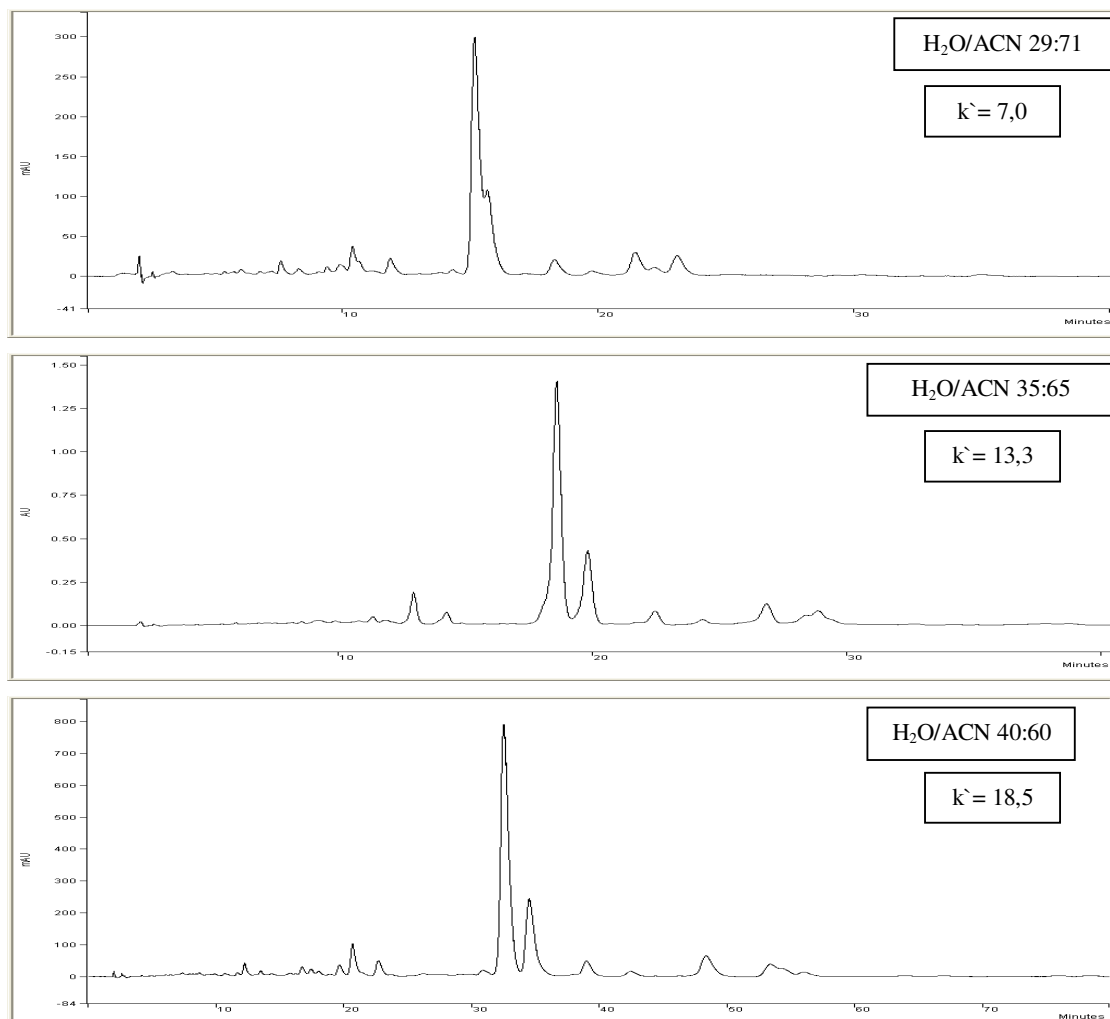


Figura 9. Cromatogramas do desenvolvimento cromatográfico para o ajuste da força de eluição da FM ($k' 7 - 18$) em CLAE-UV da subfração FA9 com mistura binária H₂O/ACN.

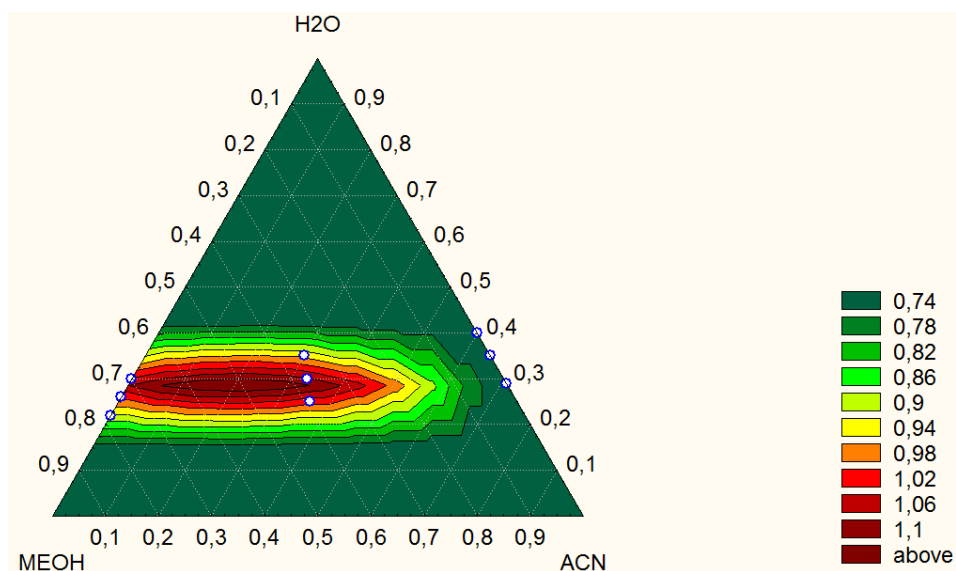
Observa-se na figura 9 a inversão dos dois picos majoritários, seno que isso ocorre por causa da diferença de seletividade da FM quando a mistura H₂O/MeOH é substituída por H₂O/ACN.

Após a otimização do fator de retenção, calculou-se a resolução para o par de picos cromatográficos com pior separação e, a partir disso, foi construída uma curva de superfície de resposta para se obter a melhor composição da FM (Figura 10) visando a melhor resolução do par de picos mais difícil de separar. A Tabela 4 apresenta a composição da FM e a resolução cromatográfica para os picos com menor resolução.

Tabela 4. Composição da FM e resolução cromatográfica dos picos com menor resolução.

H ₂ O (%)	MeOH (%)	ACN (%)	Resolução
22	78	0	0,80
26	74	0	1,25
27	73	0	1,25
29	0	71	0,70
35	0	65	1,25
40	0	60	1,25
25	39	36	0,80
30	37	33	1,25
33	37	30	1,00

Com o planejamento de misturas foi possível construir a curva de superfície (Figura 10), que apresenta uma maior resolução para a composição de FM ternária H₂O/MeOH/ACN 30:50:20 (v/v). Para verificar a eficácia desta otimização foi feita uma análise cromatográfica utilizando essa FM (Figura 11). Esta análise apresentou boa separação cromatográfica entre os picos, confirmando a eficácia do planejamento realizado, e foi utilizada para a continuidade do trabalho, ou seja, o isolamento das substâncias majoritárias dessa subfração.

**Figura 10.** Diagrama de superfície para determinação da melhor resolução para a composição de FM (H₂O/MeOH/ACN 30:50:20 (v/v)).

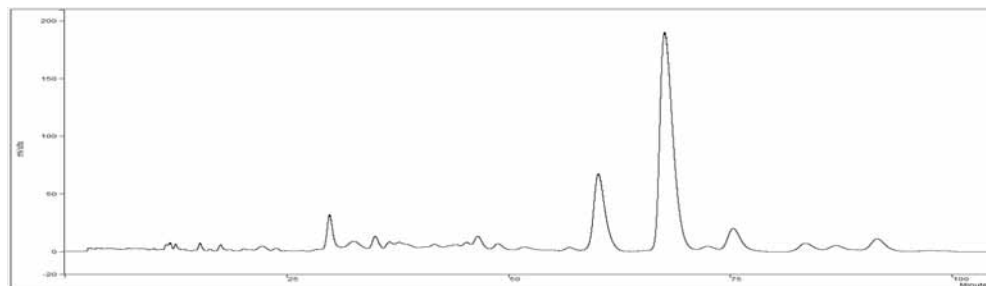


Figura 11. Cromatograma da subfração FA9, obtido na condição ótima indicada pelo gráfico de superfície de resposta da Figura 10, utilizando o equipamento CLAE-1.

Otimizada a composição da FM, o próximo passo foi ajustar o volume de injeção, carga e vazão do sistema ainda em modo analítico. O objetivo desta etapa foi realizar um planejamento variando o volume de injeção, carga e vazão do sistema cromatográfico e obtendo como resposta a resolução cromatográfica. Cada parâmetro foi avaliado em três condições diferentes: concentração (1,0; 4,0 e 7,0 mg/mL), volume de injeção (20, 50 e 80 μ L) e vazão (1,0; 1,3 e 1,6 mL/min).

A solubilidade da subfração na FM foi determinada para evitar precipitação da amostra na coluna, sendo que esta foi de 10 mg/mL. Assim, optou-se por trabalhar em uma concentração máxima igual a 70 % da solubilidade da amostra na FM (7,0 mg/mL).

Abaixo estão apresentados os resultados obtidos em cada análise cromatográfica realizada (Figura 12, 13 e 14).

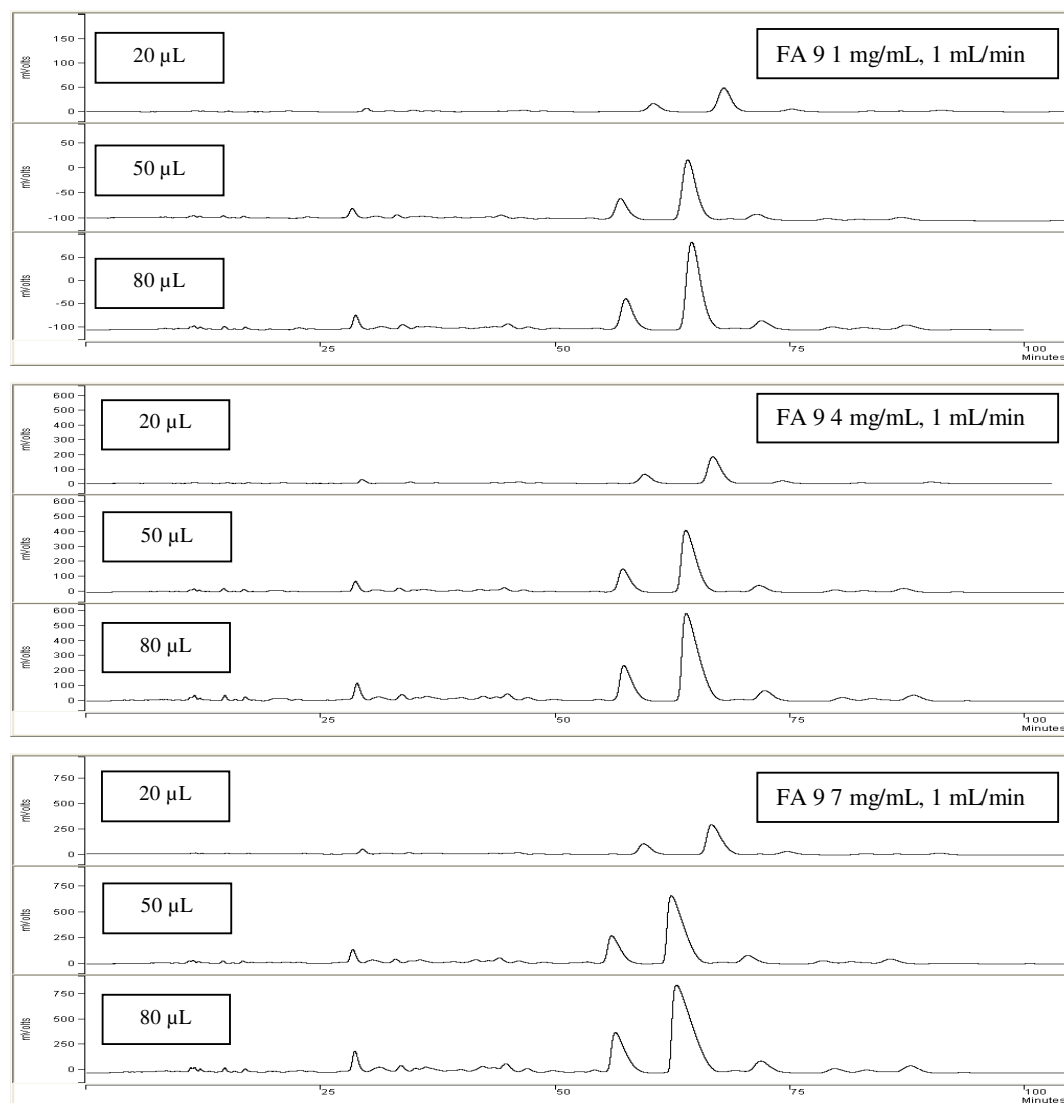


Figura 12. Cromatogramas obtidos nos testes de carga, volume injeção da amostra e vazão da FM (as condições estão nos cromatogramas).

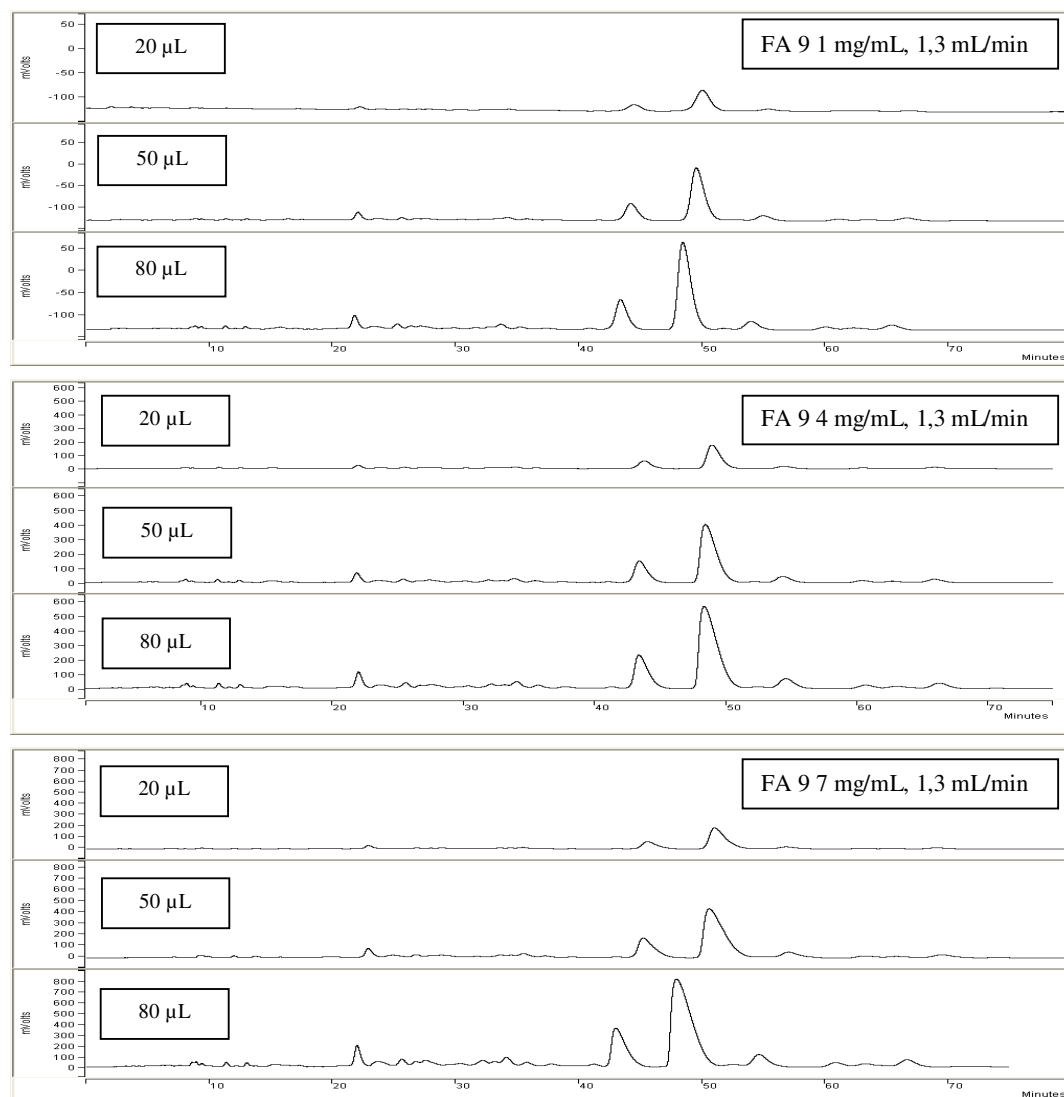


Figura 13. Cromatogramas obtidos nos testes de carga, volume injeção da amostra e vazão da FM (as condições estão nos cromatogramas).

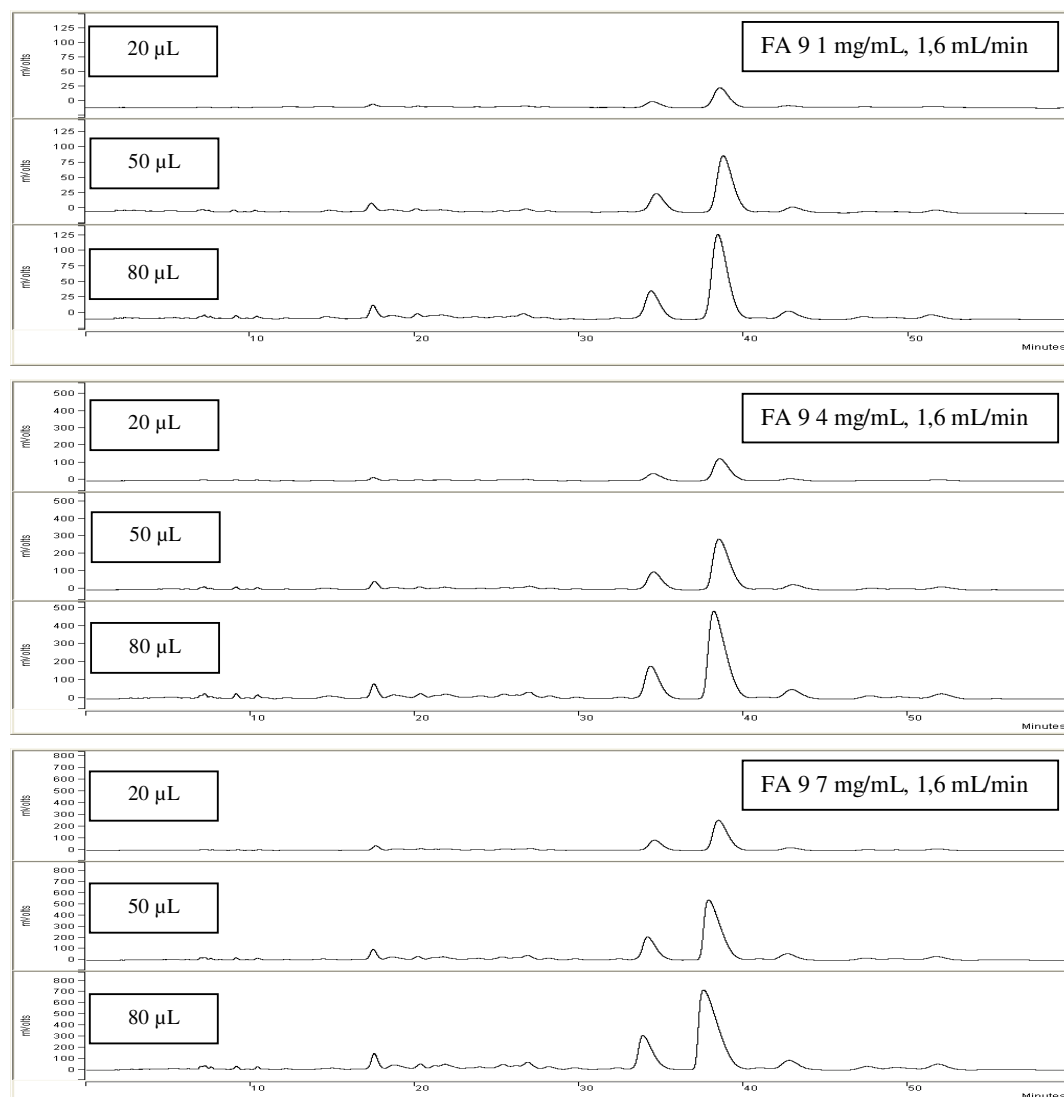


Figura 14. Cromatogramas obtidos nos testes de carga, volume injeção da amostra e vazão da FM (as condições estão nos cromatogramas).

Observa-se (Figuras 12, 13 e 14) a deformação dos picos e seu alargamento com o aumento da quantidade de amostra injetado. Ressalta-se que em pequenas quantidades de substrato a absorção dos analitos é linear e em grandes quantidades esse comportamento não ocorre (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; KNOX; PYPYER, 1986).

Após análise dos resultados, foram definidos o volume máximo de injeção (80 µL), carga por injeção [0,56 mg (7,0 mg/mL)] e vazão da FM (1,6 mL/min), pois esta condição foi a que apresentou o menor tempo de retenção, a maior quantidade e volume injetados, sem perda significativa de resolução entre os picos. As demais condições, embora apresentem boa separação, não foram selecionadas, pois apresentam tempos de análise longos e/ou menor capacidade de amostra injetada.

Utilizando o fator de escalonamento de 21,2 (item 5.6, pag. 27-28), calculou-se para a coluna preparativa os valores dos parâmetros estudados: volume de injeção ($V_{inj\ prep} = 1,7$ mL), carga por injeção ($C_{col\ prep} = 11,9$ mg) e vazão ($F_{col\ prep} = 33,0$ mL/min). O cromatograma no modo preparativo (Figura 15), obtido no equipamento CLAE 3, demonstra a adequada transferência de escala (analítica – preparativa) para o método desenvolvido.

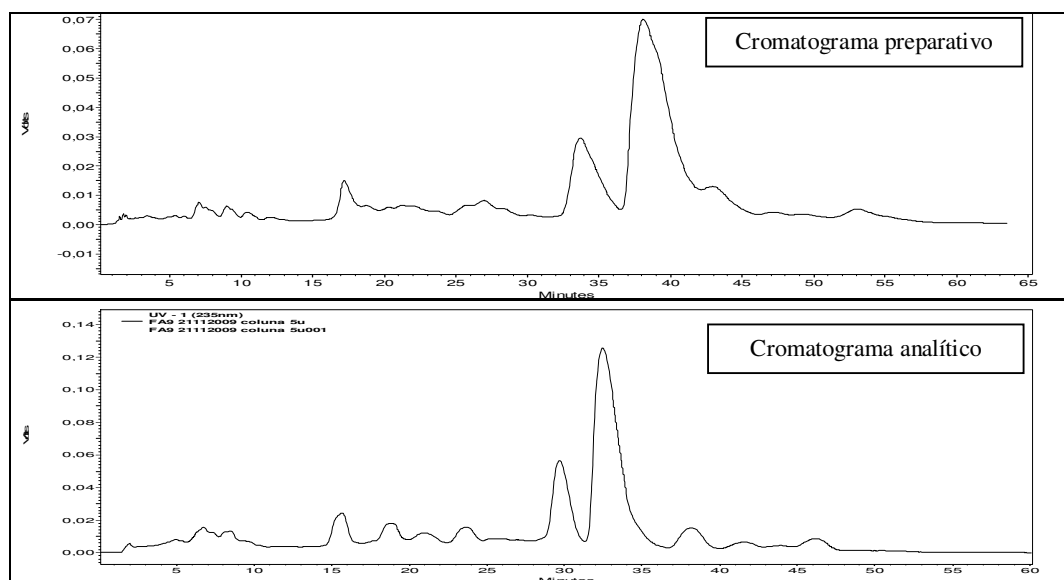


Figura 15. Cromatogramas em modo analítico e preparativo, a partir das condições otimizadas: volume de injeção (80 μ L/ 1,7 mL), carga (0,56 mg/ 11,9 mg) e vazão (1,6 mL/min/ 33 mL/min), (coluna Phenomenex® Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10 μ m).

6.4. Isolamento e purificação em CLAE preparativo

Foram avaliados dois modos preparativos para a purificação de casearinas da subfração FA9: purificação por passagem única na coluna preparativa e purificação utilizando o modo preparativo reciclante para a subfração FA18. Em ambos os casos partiu-se das condições cromatográficas otimizadas em coluna analítica.

6.4.1 Isolamento no modo isocrático

Desenvolvido o método e definidos os parâmetros de volume de injeção, carga e vazão em coluna analítica e com seu devido escalonamento para a coluna preparativa, partiu-se para o isolamento das duas substâncias majoritárias nesta fração (FA9).

Apesar do estudo de carga ter sido realizado no modo analítico, também foram feitos testes de carga para avaliar a pureza das duas substâncias a serem isoladas já em modo preparativo, injetando-se 11,9 mg; 7,0 mg e 28,0 mg da subfração.

Na primeira análise preparativa utilizando as condições de carga estabelecidas, realizou-se o fatiamento dos dois picos majoritários, com o objetivo de avaliar a pureza das substâncias nas várias porções de cada pico e assim determinar os melhores pontos de cortes das frações. Utilizou-se coletor automático, programado para fatiar os picos a cada 15 mL de FM (Figura 16). Foi retirada uma alíquota de cada fração (fatias) para análise em CLAE-DAD, com volume de injeção de 50 μ L (Tabela 5). As frações (fatias) foram reunidas de acordo com o grau de pureza observado nos respectivos cromatogramas, sendo que, para o primeiro pico, as frações (fatias) reunidas foram de 4 a 9, obtendo-se a substância referente a este pico com 71% de pureza (Figura 17 A) e para o segundo pico, foram reunidas as frações 13 a 19, obtendo-se um teor de 80% de pureza para essa segunda substância (Figura 17 B). Esses teores de pureza foram determinados de forma preliminar, a partir da porcentagem de área normalizada obtida nos cromatogramas, respectivamente.

Foram realizados os experimentos, da mesma forma, para injeção com quantidades de 7,0 e 28,0 mg (Figuras 18 e 19).

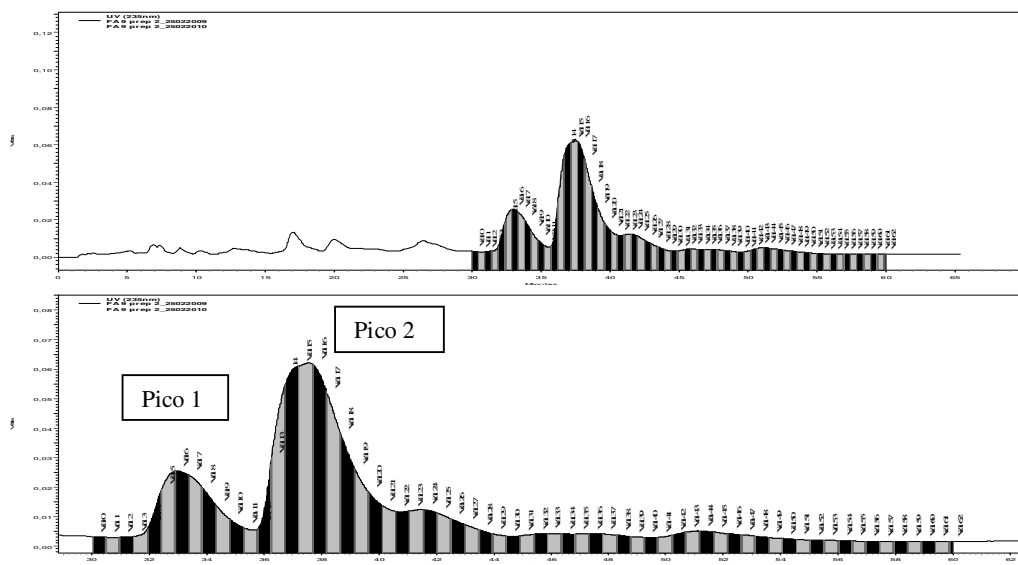
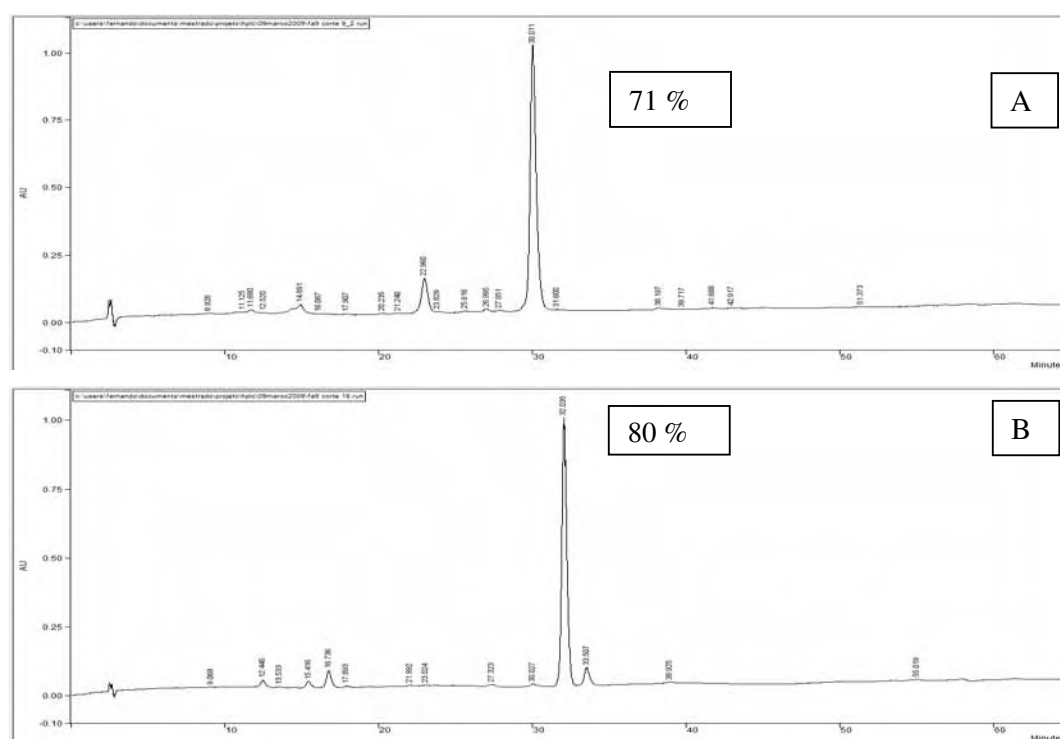


Figura 16. Cromatograma em modo preparativo para avaliação da pureza dos dois picos majoritários, volume injeção (1,7 mL), carga por injeção (11,9 mg) e vazão (33,0 mL/min), Phenomenex® Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10 μ m.

Tabela 5. Avaliação da pureza cromatográfica após injeção em CLAE preparativo.

Tubo ensaio	Pureza (%)	Tubo ensaio	Pureza (%)
4	80	16	93
5	79	17	92
6	84	18	93
7	84	19	93
8	84	20	92
9	81	21	77
10	83	22	87
11	84	23	91
12	84	24	94
13	94	25	97
14	95	26	89
15	94		

**Figura 17.** Avaliação da pureza em CLAE analítico após reunião dos tubos de ensaio, primeiro pico acima e segundo pico abaixo.

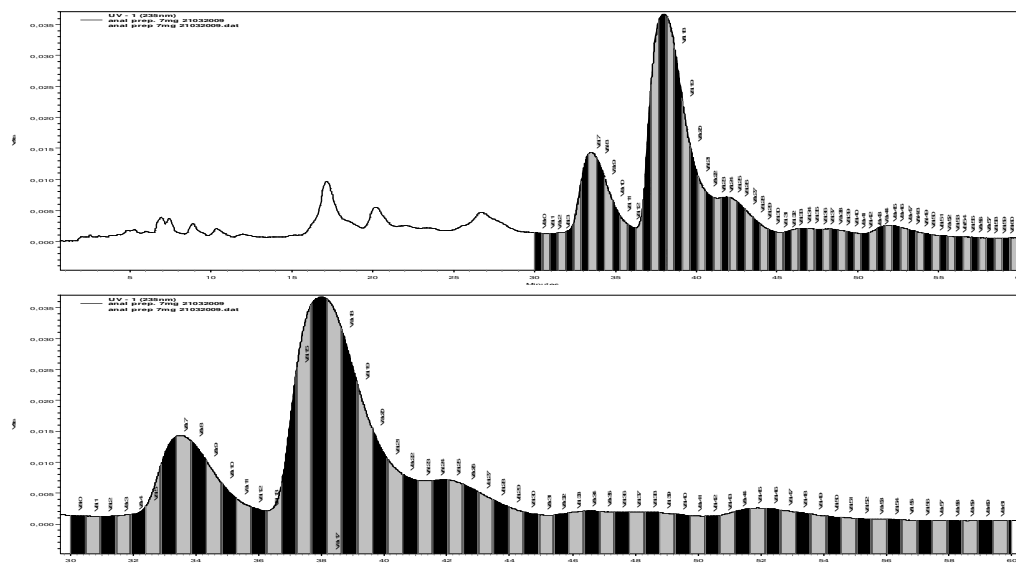


Figura 18. Cromatograma em modo preparativo para avaliação da pureza dos dois picos majoritários, carga por injeção (7,0 mg) e vazão (33,0 mL/min), Phenomenex® Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10µm.

Tabela 6. Avaliação da pureza cromatográfica após injeção em CLAE preparativo com carga de 7 mg.

T. Ensaio	Pureza (%)	T. Ensaio	Pureza (%)
4	Não identificado	13	64
5	72,0	14	82,3
6	Não identificado	15	92,4
7	71,0	16	92,8
8	75,4	17	92,5
9	66,1	18	92,3
10	78	19	90,1
11	61	20	100,0
12	66,4	21	86,3

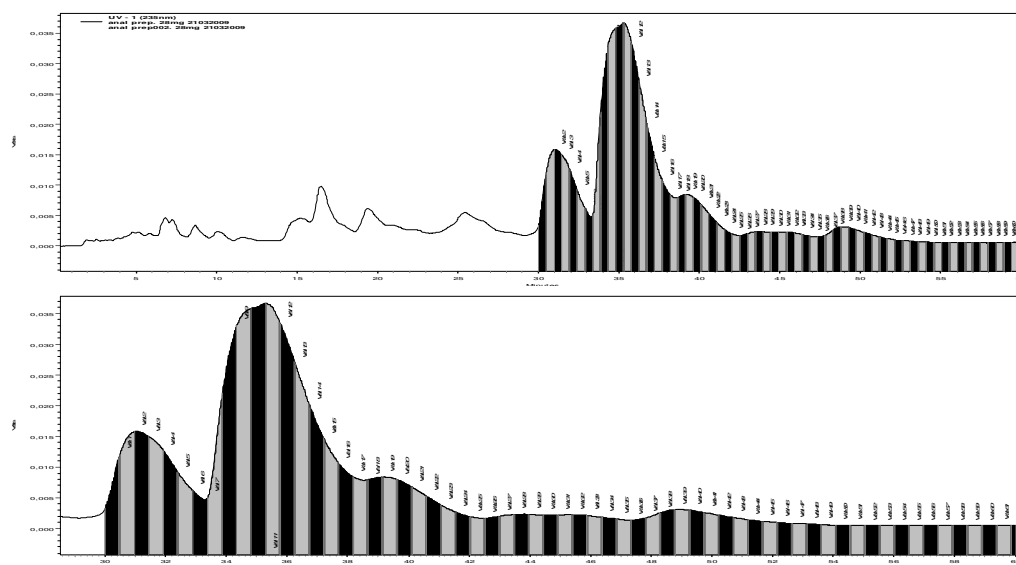


Figura 19. Cromatograma em modo preparativo para avaliação da pureza dos dois picos majoritários, carga por injeção (28,0 mg) e vazão (33,0 mL/min), Phenomenex® Luna C-18. 250 x 21,2 mm, 10 µm.

Tabela 7. Avaliação da pureza cromatográfica após injeção em CLAE preparativo com carga de 28 mg.

T. Ensaio	Pureza (%)	T. Ensaio	Pureza (%)
0	77,0	10	92,7
1	94,9	11	91,4
2	96,3	12	91,2
3	91,7	13	89,9
4	89,0	14	88,2
5	83,4	15	83,8
6	70,2	16	78,6
7	76,4,8	17	80,1
8	91,6	18	80,7
9	93,1	19	84,7

As partir das Tabelas 6 e 7 é possível avaliar o nível de pureza aplicando-se tanto 7,0 mg como 28,0 mg. Observou-se que os dois picos majoritários continuara apresentando contaminação mesmo com uma menor carga por injeção, sendo necessário um novo procedimento cromatográfico para obter estas substâncias com pureza maior que 95%. Assim, foi escolhida para isolamento das substâncias a condição que apresentou maior quantidade de carga (28,0 mg) e coletando sempre a região central dos picos.

Desta forma, foram utilizados 500 mg da subfração FA9, subdivididos em 18 injeções de ~28 mg, para o isolamento destas duas substâncias majoritárias. Obtiveram-se 10 mg do primeiro pico (Pico 1) e 78,1 mg do segundo (Pico 2). O Pico 2 apresentou duas contaminações, a primeira apresentando um ombro no final do pico 2 e o pico 3 e, desta forma, a fração foi submetida novamente em CLAE preparativa com FM constituída de H₂O/MeOH 20:80 (v/v) e vazão de 17 mL/min (Figura 20).

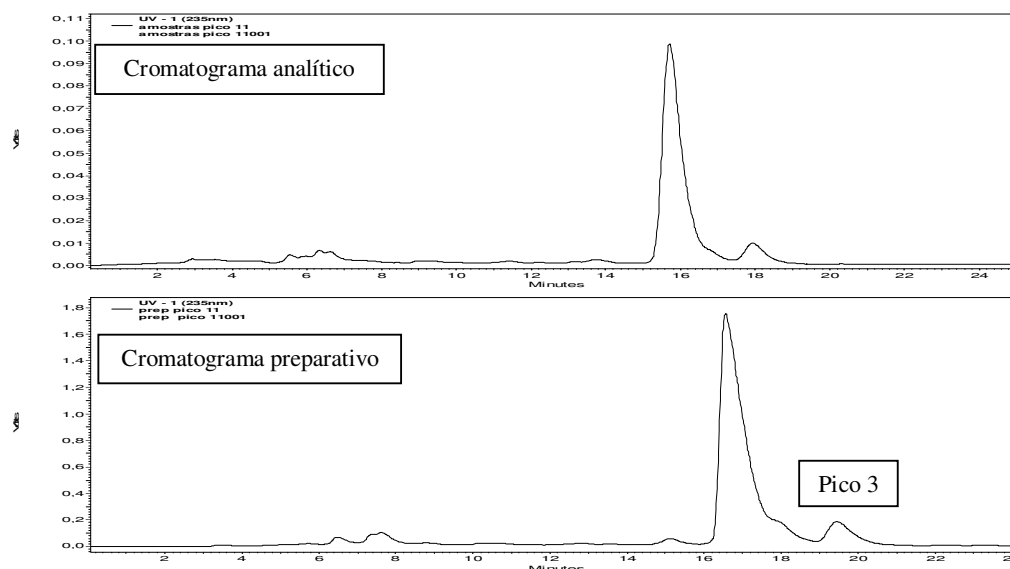


Figura 20. Cromatogramas em modo analítico (acima) e preparativo (abaixo) massa aplicada de 78,1 mg. Coluna Phenomenex® Luna C-18. 250 x 4,6 mm, 5 µm, vazão 0,8 mL/min e Coluna Phenomenex® Gemini C-18. 250 x 21,2 mm, 5 µm, vazão de 17 mL/min).

Ao avaliar os cromatogramas (Figura 20), foi possível constatar uma boa resolução cromatográfica no modo analítico, importante fator para se obter essa substância com alta pureza. Utilizando essa condição cromatográfica no modo preparativo, obtiveram-se 30 mg da substância correspondentes ao pico 2 e 3 mg do contaminante eluido em aproximadamente 20 min (Figura 20, pico 3).

6.4.2 Isolamento no modo reciclante

No desenvolvimento em modo reciclante, para o isolamento de casearinas, primeiramente foi ajustada a força de eluição da FM móvel binária H₂O/MeOH 15:85 (v/v), vazão de 0,8 mL/ min em coluna analítica e posterior transferência de escala para a coluna preparativa, com vazão de 17 mL/ min (Figura 21). Essa condição foi otimizada para a subfração FA18, pois esta era constituída principalmente pela caseargrewiina F, que também apresentou resultados bons para a atividade antiulcerogênica no trabalho de Santos (2008) e na proteção contra danos no DNA em baixas concentrações (OLIVEIRA et al., 2009).

Foi possível obter o constituinte principal por este processo de isolamento, modo reciclante, a partir da subfração FA18, em que o pico majoritário foi submetido a seis ciclos antes da coleta. Em cada ciclo o início e final do pico foram descartados para obtenção de maior pureza no pico principal, evitando a contaminação pelo alargamento desse com a

substância adjacente (Figura 21). Aplicou-se 350 mg da amostra em 7 injeções de 50 mg cada, obtendo-se ao final 60 mg da substância principal.

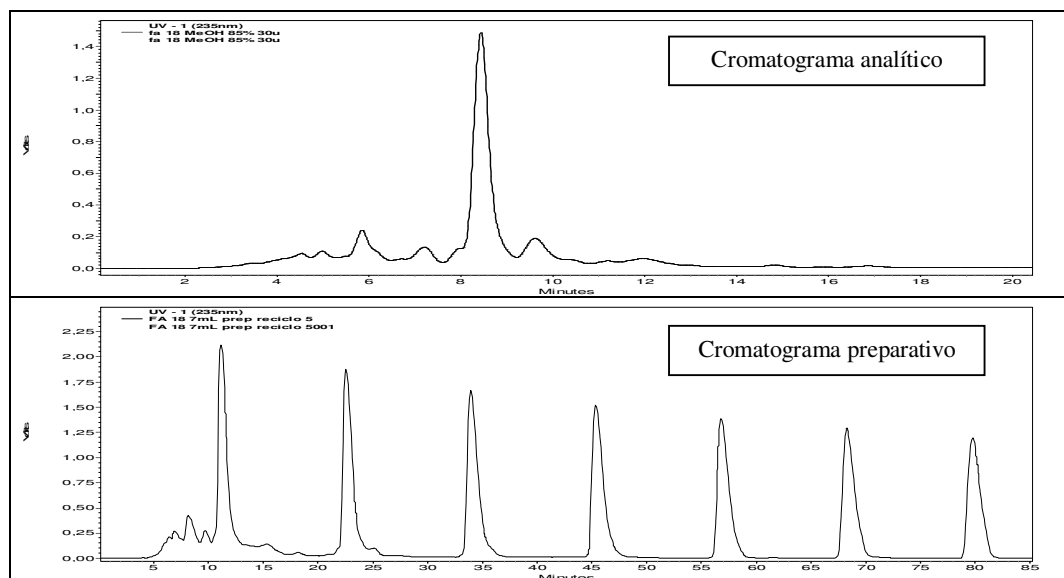


Figura 21. Cromatogramas em modo analítico (acima) e preparativo modo reciclante (abaixo); volume de injeção (7,0 mL), carga (50,0 mg) e vazão (17 mL/min), (coluna Phenomenex® Gemini C-18. 250 x 21,2 mm, 5 µm).

6.5. Identificação e elucidação estrutural

As substâncias foram identificadas como casearina J (Pico 1, 10 mg), casearina X (Pico 2, 30 mg), uma casearina inédita nomeada casearina Z (Pico 3, 3 mg), isoladas a partir da subfração FA9, e a caseargrewiina F (60 mg) obtida no modo reciclante a partir da subfração FA18 (Figuras 22, 23, 24 e 25).

A casearina J foi descrita pela primeira vez por Morita e colaboradores (1991), sendo o único relato de isolamento na literatura. A casearina X é bem conhecida neste grupo de pesquisa, tendo sido isolada anteriormente nos trabalhos de mestrado (SANTOS, 2001) e doutorado (TININIS, 2006; SANTOS, 2008) a partir do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*. A caseargrewiina F foi isolada primeiramente dos frutos de *Casearia grewiifolia* (KANOKMEDHAKUL; KANOKMEDHAKUL; BUAYAIRAKSA, 2007) e também nos trabalhos de Tininis (2006) e Santos (2008), a partir do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*.

6.5.1. Casearina J

A casearina J foi obtida como um pó branco. Seu espectro de RMN de ^{13}C , obtido em piridina deuterada, apresenta 31 carbonos (Anexos 4-5, pags. 105-106), semelhantes àqueles apresentados por outras casearianas descritas na literatura (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990) e similar à isolada por Morita e colaboradores (1991), espectros obtido em clorofórmio deuterado.

O espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) no modo positivo (Anexo 1, pag. 102), apresentou sinais relativos aos íons $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e $[\text{M}+\text{K}]^+$ com valores de m/z 585,3034 e 601,2904 (massas teóricas calculadas para $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_9\text{Na}^+$ e $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_9\text{K}^+$ foram, respectivamente, 585,3034 e 601,2773). A banda de absorção no UV em 234,6 nm é característica de dieno conjugado das casearinas (CARVALHO et al, 1998), cuja presença pode ser confirmada pelos sinais observados na região olefínica do espectro de RMN de ^1H (Anexo 3, pag 104), mostrando os acoplamentos *cis/trans* da ligação dupla terminal monossustituída H-15_a e H-15_b [5,21 ppm (d, $J = 11,0$ Hz), 5,24 ppm (d, $J = 17,0$ Hz)], com hidrogênio vicinal, H-14, em 6,68 ppm (dd, $J = 11,0$ e 17 Hz), além do outro sinal, H-12, em 5,50 ppm (d, $J = 8,0$ Hz), que pode ser atribuído ao hidrogênio da outra dupla ligação conjugada.

O sistema decalínico é confirmado pela similaridade dos deslocamentos químicos de ^{13}C com os apresentados na literatura, além das correlações apresentadas nos mapas de contorno COSY e HMBC.

Os sinais de carbonos metínicos oxigenados em 97,1 e 99,1 ppm (Anexo 4, pag. 105), C-18 e C-19 respectivamente, indicam a presença do anel diacetálico no anel C. A correlação entre o hidrogênio H-19 (s, 7,24 ppm) e os carbonos C-5 e C-6 (55,0 e 74,7 ppm, respectivamente) no mapa de contorno HMBC (Anexo 12, pag. 113), definem a posição deste, além disso, a correlação entre esse hidrogênio H-19 e o carbono carbonílico em 169,7 ppm caracteriza a posição do substituinte acetato (Anexo 15, pag. 116).

O butanoato em 173,6 ppm foi posicionado na posição 18.

A posição da metoxila foi determinada pela correlação entre os hidrogênios da metoxila (O-CH₃, s, 3,39 ppm) com o C-2 (73,2 ppm) (Anexo 13, pag. 114).

Os hidrogênios H-20 (s, 0,98 ppm) apresentam correlação com o C-9 (40,1 ppm) (Anexo 11, pag. 112) e a correlação entre H-20 e C-11 (30,9 ppm) sugere o posicionamento da cadeia lateral no C-9 (Anexo 11, pag. 112). As correlações no COSY entre os hidrogênios H-17 (d, 1,04 ppm, $J = 7,0$ Hz) e H-8 (t, 5,64 ppm, $J = 11,0$ Hz) sugerem a posição deste

grupo metila (Anexo 16, pag. 117), além das correlações no mapa de contorno HMBC entre os H-17 com os carbonos C-7, C-8 e C-9 (76,4; 41,7 e 40,1 ppm) (Anexo 13 e 11, pags.114 e 112).

As casearina já isoladas com configuração *trans* entre C-17 e C-20, apresentam deslocamento químico cerca de 15,0 e 26,0 ppm. Quando existe um substituinte oxigenado em C-7, é observada uma absorção em menor frequência para C-17 (11,0 ppm). Este fato sugere a existência de um efeito de blindagem (gama) produzido pelo substituinte oxigenado presente em C-7 sobre o C-17 (SANTOS, 2008). No caso da casearina J, as absorções em 11,7 e 26,0 ppm para C-17 e C-20, respectivamente, indicam a relação *trans* entre estas metilas. Além disso, com essa informação é possível sugerir o posicionamento do segundo grupo butanoato com o carbono carbonílico em 173,4 ppm no C-7.

A correlação entre H-11 (dd, 2,69 ppm, $J = 9,0$ e $16,0$ Hz) e H-12 (d, 5,5 ppm; $J = 9,0$ Hz) correspondente as ligações presentes no grupo lateral (Anexo 17, pag.118).

Os hidrogênios H-16 (s, 1,75 ppm) apresentam correlação com os carbonos C-12; C-13, C-14, C-15 (127,5; 134,1; 134,3; ppm) (Anexo 14, pag. 115).

A casearina J e dextrorrotatória $+29,0^\circ$ (c 0,7, CHCl_3) consistente com o resultado apresentado por Morita e colaboradores (1991) $+29,9^\circ$.

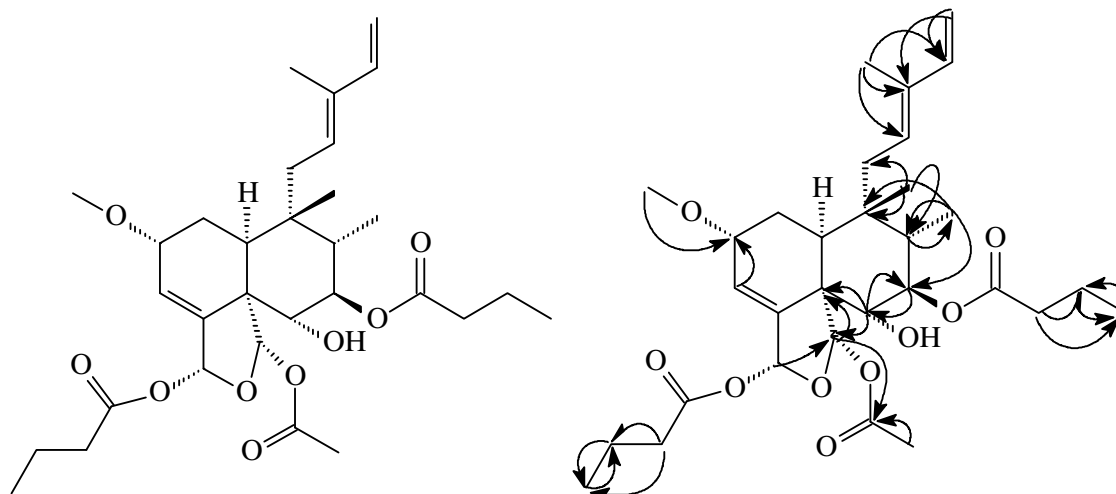


Figura 22: Casearina J e principais correlações encontradas no mapa de contorno HMBC, respectivamente.

Tabela 8. Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C , ^1H obtidos em 125 e 500 MHz, respectivamente, gHMBC e gCOSY, em piridina- d_5 para a casearina J.

Casearina J					Morita et al. (1991) em CDCl_3
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm/ J Hz)	gHMBC (ppm)	gCOSY (ppm)	^{13}C (ppm)
C1	26,5 t	1,99	-	2,78	25,6 t
C2	73,3 d	3,97 t (4)	-		72,6 d
C3	123,8 d	6,38 d (4)	73,3		123,5 d
C4	144,5 s	-	-		142,9 s
C5	55,0 s	-	-		53,8 s
C6	74,7 d	4,24 d (10)	55,0; 76,4; 99,1		75,2 d
C7	76,4 d	5,64 t (11)	74,7	2,07	75,4 d
C8	41,7 d	2,07 m	11,7	1,04; 5,64	41,1 d
C9	40,1 s	-	-		39,4 s
C10	36,9 d	2,78 dd (3; 13)			35,8 d
C11	30,9 t	2,69 dd (9,0; 16)		5,5	30,3 t
C12	127,5 d	5,50 d (8,0)		2,69	125,8 d
C13	134,1 s	-	-		133,9 s
C14	134,3 d	6,68 dd (10,5; 17,3)		5,24	133,4 d
C15	114,7 t	5,21 dd (11) 5,24 (17)	20,4; 134,1; 134,3	6,68	114,6 t
C16	20,4 q	1,75 s	114,7; 127,5; 134,1; 134,3		20,2 q
C17	11,7 q	1,04 d (7)	40,1; 41,7; 76,4	2,07	11,1 q
C18	97,1 d	7,14 t (1,5)	99,1		95,6 d
C19	99,1 d	7,24 s	74,7; 55,0; 97,1; 144,5; 169,7		97,5 d
C20	26,0 q	0,98 s	30,9; 41,7; 40,1; 37,0		25,4 q
OAc	21,8 q	1,92 s	169,7		21,3 q
OAc	169,7 s	-			169,0 s
OBu	14,1 q	0,84 t (7,5)	18,9	1,58	13,5 q
OBu	13,8 q	0,90 t (7,5)	19,2	0,84; 2,35	13,7 q
OBu	18,9 t	1,57 m	13,8	1,58	18,3 t
OBu	19,1 t	1,66 m	14,1		18,6 t
OBu	36,7 t	2,35 t (7,5)	13,8; 18,9		36,3 t
OBu	36,8 t	2,40 m	14,1; 19,2		36,4 t
OBu	173,4 s	-			173,7 s
OBu	173,6 s	-			174,3 s
OMe	56,9 q	3,39 s	73,3		57,0 q

6.5.2. Casearina X e caseargrewiina F

A casearina X e a caseargrewiina F (Figuras 23 e 24) foram identificadas comparando-se os respectivos espectros de ^1H e ^{13}C (Anexos 18 a 22 e 23 a 26, pags. 119-123 e 124-127) com os dados obtidos por Santos (2008) para estas duas substâncias (Tabela 9 e 10). Como os

deslocamentos químicos são idênticos e as substâncias foram obtidas da mesma planta estudada por Santos, não foi necessário utilizar técnicas bidimensionais para confirmação estrutural destas casearinas.

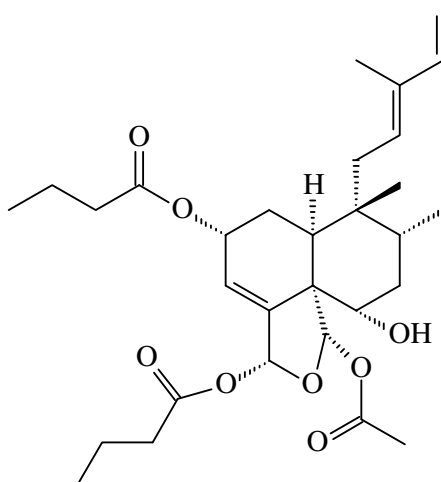


Figura 23. Casearina X

Tabela 9. Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H obtidos em 125 e 500 MHz, respectivamente, em piridina- d_5 para a casearina X.

Casearina X			Dados obtidos por Santos (2008)
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm/ J Hz)	^{13}C (ppm)
C1	27,6 <i>t</i>	2,08 m; 2,14m	27,6 <i>t</i>
C2	67,4 <i>d</i>	5,73 t (4,5)	67,4 <i>d</i>
C3	121,6 <i>d</i>	6,34 dl (4,5)	121,6 <i>d</i>
C4	147,8 <i>s</i>	-	147,8 <i>s</i>
C5	54,8 <i>s</i>	-	54,8 <i>s</i>
C6	72,8 <i>d</i>	4,18 dd (11,0; 5,0)	72,9 <i>d</i>
C7	38,1 <i>t</i>	1,88- 1,94 m	38,1 <i>t</i>
C8	37,0 <i>d</i>	nd	37,0 <i>d</i>
C9	38,6 <i>s</i>	-	38,6 <i>s</i>
C10	37,7 <i>d</i>	2,76 dd (13,5; 3,5)	37,7 <i>d</i>
C11	30,0 <i>t</i>	1,93 m 2,49 dd (16,0; 9,0)	30,0 <i>t</i>
C12	128,4 <i>d</i>	5,64 dl (9,0)	128,4 <i>d</i>
C13	134,0 <i>s</i>	-	134,0 <i>s</i>
C14	134,4 <i>d</i>	6,81 dd (17,0; 11,0)	134,4 <i>d</i>
C15	114,6 <i>t</i>	5,13 d (11,0) 5,26 d (17,0)	114,6 <i>t</i>
C16	20,7 <i>q</i>	1,84 sl	20,7 <i>q</i>
C17	16,1 <i>q</i>	0,88 d (7,5)	16,1 <i>q</i>
C18	97,3 <i>d</i>	7,45 t (1,5)	97,3 <i>d</i>
C19	99,2 <i>d</i>	7,16 s	99,2 <i>d</i>
C20	25,5 <i>q</i>	0,87 s	25,5 <i>q</i>
OAc	22,0 <i>q</i>	2,04 s	22,0 <i>q</i>
OAc	170,0 <i>s</i>	-	170,0 <i>s</i>
OBu	13,8 <i>q</i>	0,84 t (7,5)	13,8 <i>q</i>
OBu	14,0 <i>q</i>	0,89 t (7,4)	14,0 <i>q</i>
OBu	18,9 <i>t</i>	1,6 m	18,9 <i>t</i>
OBu	19,2 <i>t</i>	1,6 m	19,2 <i>t</i>
OBu	36,7 <i>t</i>	2,19 m	36,7 <i>t</i>
OBu	36,7 <i>t</i>	2,32 m	36,7 <i>t</i>
OBu	173,3 <i>s</i>	-	173,3 <i>s</i>
OBu	173,4 <i>s</i>	-	173,4 <i>s</i>

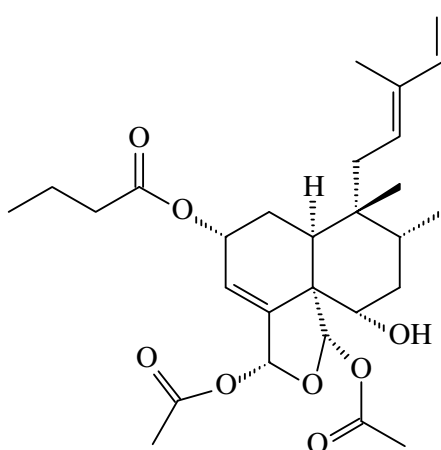


Figura 24. Caseargwiina F

Estas substâncias apresentaram rotação ótica específica de $+50,3^\circ$ (c 1,0, MeOH) para a casearina X e $+53,1^\circ$ (c 1,0, MeOH) para a caseargwiina F. Estes resultados demonstram que essas substâncias são dextrorrotatórias. Esses valores contribuem para a identificação dessas substâncias quando comparados com os resultados obtidos por SANTOS (2008) para a casearina X ($+54,3^\circ$) e para a caseargwiina F ($+55,1^\circ$) e confirmam as respectivas configurações relativas.

Tabela 10. Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H obtidos em 75 e 300 MHz, respectivamente, em piridina- d_5 para a caseargrewiina F.

Caseargrewiina F			Dados obtidos por Santos (2008)	
^{13}C	^{13}C	^1H (ppm J Hz)	^{13}C	^1H
C1	27,7 <i>t</i>	2,40- 2,45 <i>m</i>	27,4 <i>t</i>	2,05-2,10 <i>m</i>
C2	67,3 <i>d</i>	6,04 <i>t</i> (4,2)	67,0 <i>d</i>	5,73 <i>t</i> (4,0)
C3	121,6 <i>d</i>	6,40 <i>dl</i> (3,9)	121,3 <i>d</i>	6,33 <i>dl</i> (4,0)
C4	147,7 <i>s</i>	-	147,3 <i>s</i>	-
C5	54,8 <i>s</i>	-	54,5 <i>s</i>	-
C6	72,8 <i>d</i>	4,49 <i>dd</i> (9,9; 5,7)	72,5 <i>d</i>	4,17 <i>dd</i> (11,0; 5,0)
C7	38,1 <i>t</i>	2,20- 2,26 <i>m</i>	37,8 <i>t</i>	1,88- 1,94 <i>m</i>
C8	37,7 <i>d</i>	nd ¹	37,4 <i>d</i>	nd ¹
C9	38,6 <i>s</i>	-	38,3 <i>s</i>	-
C10	37,0 <i>d</i>	3,06 <i>dd</i> (12,9; 4,2)	36,7 <i>d</i>	2,74 <i>dd</i> (13,5; 3,5)
C11	30,0 <i>d</i>	2,79 <i>dd</i> (16,0; 9,3)	29,7 <i>d</i>	1,86- 1,92 <i>m</i> 2,48 <i>dd</i> (16,0; 9,0)
C12	128,4 <i>d</i>		128,1 <i>d</i>	5,63 <i>dl</i> (9,0)
C13	134,0 <i>s</i>	-	133,7 <i>s</i>	-
C14	134,4 <i>d</i>	7,21 <i>dd</i> (17,3 ;10,8)	134,1 <i>d</i>	6,80 <i>dd</i> (17,0; 11,0)
C15	114,6 <i>t</i>	5,43 <i>d</i> (11,1) 5,55 <i>d</i> (17,4)	114,3 <i>t</i>	5,12 <i>d</i> (11,0) 5,25 <i>d</i> (17,0)
C16	20,7 <i>q</i>	2,14 <i>sl</i>	20,4 <i>q</i>	1,83 <i>sl</i>
C17	16,1 <i>q</i>	1,19 <i>m</i>	15,8 <i>q</i>	0,88 <i>d</i> (6,0)
C18	97,4 <i>d</i>	7,75 <i>t</i> (1,5)	97,1 <i>d</i>	7,43 <i>t</i> (1,5)
C19	99,1 <i>d</i>	7,45 <i>s</i>	98,8 <i>d</i>	7,16 <i>s</i>
C20	25,5 <i>q</i>	1,17 <i>s</i>	25,2 <i>q</i>	0,87 <i>s</i>
OAc	21,4 <i>q</i>	2,32 <i>s</i>	21,1 <i>q</i>	2,02 <i>s</i>
OAc	170,1	-	169,8 <i>s</i>	-
OAc	22,0 <i>q</i>	2,33 <i>s</i>	21,7 <i>q</i>	2,02 <i>s</i>
OAc	170,8 <i>s</i>	-	170,5 <i>s</i>	-
OBu	14,0 <i>q</i>	1,16 <i>t</i>	13,7 <i>q</i>	0,88 <i>t</i> (7,0)
OBu	19,2 <i>t</i>	1,93 <i>m</i>	18,9 <i>t</i>	1,62 <i>m</i>
OBu	36,7 <i>t</i>	2,48 <i>m</i>	36,4 <i>t</i>	2,18 <i>m</i>
OBu	173,3	-	173,0 <i>s</i>	-

6.5.3. Casearina Z

A seguir é apresentada a elucidação estrutural preliminar da casearina Z, pois não foram obtidos todos os experimentos de RMN necessários para a determinação da configuração relativa, além dos espectros no IV, UV e de massas.

À esta substância foi atribuída a fórmula molecular $C_{28}H_{42}O_7$. Os dados de RMN de ^{13}C e DEPT (Tabela 11) apresentam 28 sinais de carbono (Anexo 30-31, pags. 131-132), sendo 6 quartenários, 9 metínicos, 7 metilenos e 6 metílicos (Anexo 32-33, pags. 133-134), semelhantes àqueles apresentados por outras casearinas (KANOKMEDHAKUL; KANOKMEDHAKUL; BUAYAIRAKSA, 2007; CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2007).

O espectro de RMN de 1H apresentou um dubleto referente à metilas em 0,85 ppm ($J = 5,5$ Hz, H-17) (Anexo 28, pag. 129) e um singlete em 0,86 ppm (H-20) (Anexo 28, pag. 129), um oximetileno em 5,66 ppm (sl, H-2) (Anexo 29, pag. 130), dois prótons metínicos em 5,74 ppm (s, H-18) e 7,11 ppm (s, H-19) e um próton olefínico trissubstituído em 6,46 ppm (d, $J = 4,0$ Hz, H-3) (Anexo 29, pag. 130) são consistente com o esqueleto básico dos diterpenos clerodânicos isolados do gênero *Casearia*, além disso os dois hidrogênios metínicos (H-18 e H-19; Anexo 29, pag. 130)) confirmam a presença do anel diacetálico (KANOKMEDHAKUL et al., 2007; CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2007).

As correlações encontradas no COSY em conjunto com as correlações encontradas no mapa de contorno HMBC ajudam a confirmar o sistema decalínico desse diterpeno clerodânico, H-1 e H-10, H-2 e H-1, H-2 e H-3, H-6 e H-7 (Anexo 44-45, pags. 143-144).

Os seis carbonos da cadeia lateral C-11 a C-16 mostram a presença de um grupo metileno terminal, consistente com a observação dos prótons 5,16 ppm (d, $J = 10,5$ Hz, H-15a) e 5,27 ppm (d, $J = 17,0$, H-15b) (Anexo 29, pag. 130), os quais acoplam com o próton em 6,85 ppm (dd, $J = 17,3$ e $10,5$, H-14) também confirmado pela correlação apresentado no COSY entre os H-14 e H-15 (Anexo 46, pag. 145). A outra dupla ligação em conjugação com a anterior é trissubstituída com sinal do próton em 5,57 ppm (dl, $J = 8,5$ Hz, H-12) apresentando correlação entre H-11 e H-12 (Anexo 45, pag. 144). Também apresenta correlações no mapa de contorno HMBC entre os prótons em 1,81 ppm (s, H-16) e os carbonos C-12 e C-14 (Anexo 43, pag. 142).

A correlação no mapa de contorno HMBC entre a metila em 2,00 ppm (s) com o carbono carbonílico em 170,0 ppm define a posição dessa (Anexo 43, pag. 142) e a correlação entre o H-19 e o mesmo carbono define a posição dessa acetoxila (Anexo 42, pag. 141).

A correlação observada no COSY entre os prótons da metila em 1,12 ppm (t, $J = 7,0$ Hz) e os prótons metilênico em 3,60/3,84 ppm demonstram sua conectividade e o deslocamento químico dos prótons em 3,60 ppm sugerem ser representativos de um grupo etóxi (Anexo 45, pag. 144). A correlação do próton H-18 e o carbono 65,1 ppm (etoxila) definem a posição desse grupo (Anexo 40, pag. 139).

Ao substituinte butanoato foi atribuído ao carbono com sinal em 67,3 ppm (C-2), consistente com os deslocamentos químicos apresentados para outras casearinas com esse substituinte em C-2 e com uma hidroxila em C-6 (72,3 ppm) (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS, 2008).

Os deslocamentos químicos do C-17 e C-20 (16,0 e 25,6 ppm, Anexo 31, pag. 132) sugerem a relação *trans* entre eles, pois para as casearinas já relatadas quando o sistema *trans* está presente, os deslocamentos químicos para essas duas metilas estão em torno de 15,0 e 26,0 ppm, enquanto que para a configuração *cis* os valores observados são de 16,0 e 18,0 ppm, respectivamente. Assim, a configuração *cis* entre a junção dos anéis A e B pode ser confirmada a partir do deslocamento químico do C-20 (SANTOS, 2008).

Esta casearina é inédita por apresentar uma etoxila em C-18. Na literatura é descrita a mesma estrutura com uma metoxila nessa posição, tendo sido isolada dos frutos de *Casearia grewiifolia* e nomeada de caseargrewiina G (KANOKMEDHAKUL; KANOKMEDHAKUL; BUAYAIRAKSA, 2007).

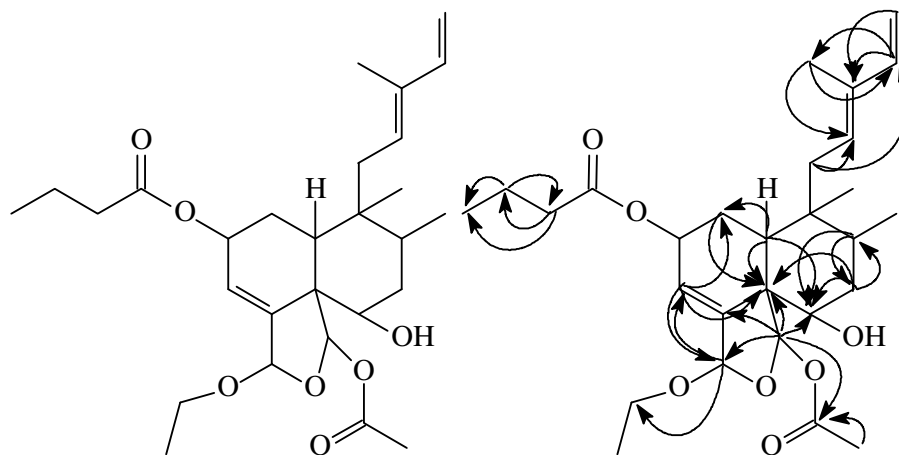


Figura 25. Casearina Z e correlações apresentadas no mapa de contorno HMBC, respectivamente.

Tabela 11. Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H obtidos em 75 e 500 MHz, respectivamente, em piridina- d_5 para a casearina Z.

Casearina Z				
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm/ J Hz)	gHMBC (ppm)	gCOSY (ppm)
C1	27,6 <i>t</i>	2,05 <i>m</i>	52,7	2,59
C2	67,3 <i>d</i>	5,66 <i>sl</i>		2,05; 6,46
C3	125,2 <i>d</i>	6,46 <i>d</i> (4,0)	27,6; 52,7; 103,7	5,66
C4	146,3 <i>s</i>	-		
C5	52,7 <i>s</i>	-		
C6	72,3 <i>d</i>	4,08 <i>dd</i> (11,0; 4,5)		1,70/1,74; 1,85
C7	36,7 <i>t</i>	1,85 <i>m</i>	35,9; 52,7; 72,3	4,08
C8	35,9 <i>d</i>	1,74 <i>m</i>	36,7; 72,3	
C9	38,5 <i>s</i>	-		
C10	38,0 <i>d</i>	2,59 <i>dd</i> (11,0; 5,0)	27,6; 52,7; 72,3	
C11	29,6 <i>t</i>	1,86 <i>m</i> ; 2,49 <i>dd</i> (16,5; 10,0)	134,4; 128,5	5,57;
C12	128,5 <i>d</i>	5,57 <i>dl</i> (8,5)		1,87; 2,49
C13	133,9 <i>s</i>	-		
C14	134,4 <i>d</i>	6,85 <i>dd</i> (17,3; 10,5)	20,6; 133,9	5,20
C15	114,6 <i>t</i>	5,16 <i>d</i> (10,5) 5,27 <i>d</i> (17,0)	133,9 133,9	6,85
C16	20,6 <i>q</i>	1,81 <i>s</i>	134,4; 128,5	
C17	16,0 <i>q</i>	0,85 <i>d</i> (5,5)		1,74
C18	103,7 <i>d</i>	5,74 <i>s</i>	52,7; 65,1; 98,8; 125,1; 146,7	
C19	98,8 <i>d</i>	7,11 <i>s</i>	52,7; 72,3; 103,7; 146,7; 170,0	
C20	25,6 <i>q</i>	0,86 <i>s</i>		
OAc	21,9 <i>q</i>	2,00 <i>s</i>	170,0	
OAc	170,0 <i>s</i>	-		
OBu	14,02 <i>q</i>	0,90 <i>t</i> (7,5)		1,65
OBu	19,2 <i>t</i>	1,64 <i>m</i>	14,0; 36,8	
OBu	36,8 <i>t</i>	2,27	14,0; 19,2	
OBu	173,3 <i>s</i>	-		
OEt	15,3 <i>q</i>	1,12 <i>t</i> (7,0)		3,60/3,84
OEt	65,1 <i>t</i>	3,60/3,84		1,12

6.6. Avaliação da pureza

6.6.1 Pureza Cromatográfica

A determinação da pureza das substâncias foi realizada por CLAE-DAD em duas etapas: inicialmente determinou-se a pureza do pico e posteriormente determinou-se a pureza cromatográfica pelo método de normalização de área.

Para cada substância isolada foram obtidos cromatogramas em CLAE-DAD no modo analítico, em duas colunas com diferentes seletividades de FE para o cálculo de pureza cromatográfica (Phenomenex® Luna C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm e Phenomenex® Luna Phenyl-Hexil, 250 x 4,6 mm, 5 µm), sendo a eluição realizada com o mesmo gradiente linear de H₂O/MeOH (35:65) até 100 % de MeOH em 60 min, mais 10 min em 100 % MeOH (Figuras 29, 30 e 31).

As Figura 26 e 27 apresentam a pureza de pico para as casearinas J, X e caseargrewiina F com resultado de 100% para as três substâncias isoladas em coluna C-18 e Fenil-Hexil, importante fator para a avaliação da pureza cromatográfica, já que é um indicativo da ausência de contaminantes coeluído com essas substâncias.

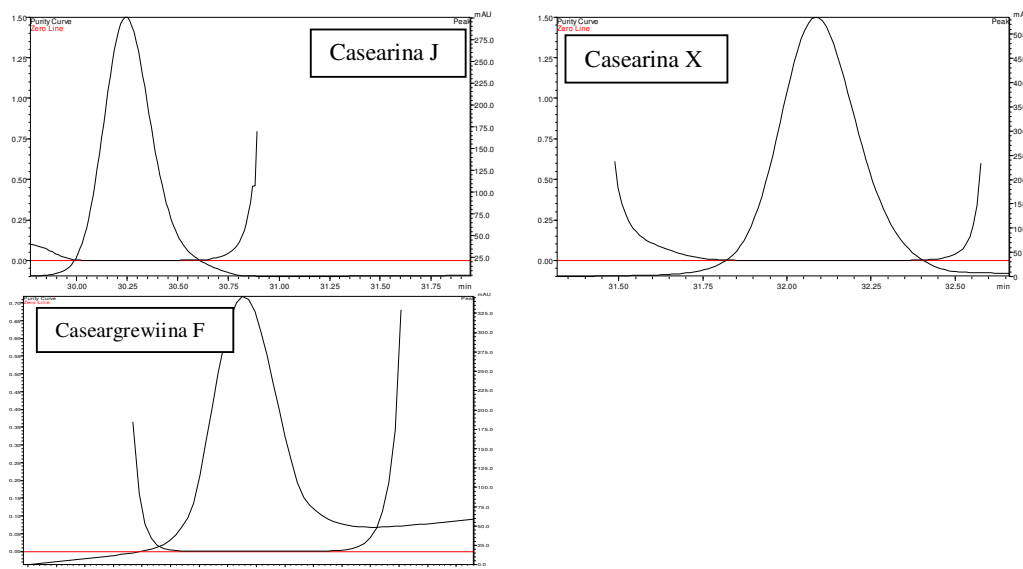


Figura 26. Análise da pureza de pico em CLAE-DAD em coluna C-18 para as casearinas J e X, e caseargrewiina F.

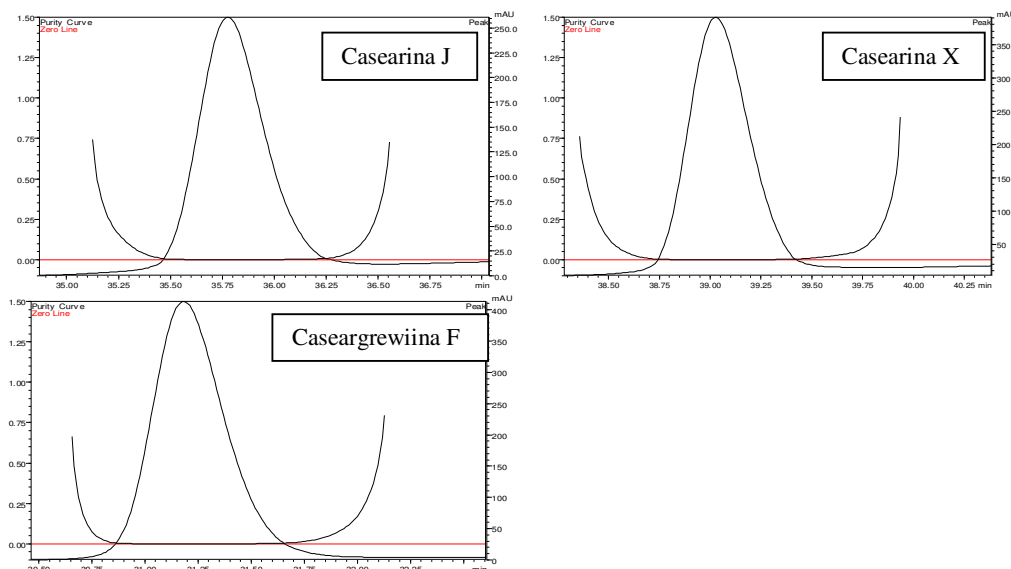


Figura 27. Análise da pureza de pico em CLAE-DAD em coluna fenil-hexil para as casearinas J e X, e caseargreina F

A análise de pureza cromatográfica incluiu uma etapa preliminar de análises realizadas logo após a última etapa de purificação, tomando-se uma alíquota das substâncias coletadas e injetando em coluna C18. Após a concentração dessas repetindo-se a análise para determinação da pureza em colunas C18 e fenil-hexil.

Para casearina J foi observada uma diminuição do grau de pureza durante a etapa de evaporação do solvente, com aumento do pico eluído em 23,5 min, o que pode ser indicativo de degradação dessa substância durante a concentração em rota evaporador (Figura 29). O espectro no UV desse contaminante (Figura 28) é semelhante aos das casearinas descritas na literatura, já que apresenta um máximo de absorção no comprimento de onda de 234 nm, característicos do dieno conjugado das casearinas. Desta forma, pode-se sugerir que a casearina J degradou sem a perda do cromóforo.

A pureza cromatográfica obtida para essa substância foi de 85,5 % e 83,4 %, respectivamente nas colunas de fase reversa C18 em Fenil-Hexil.

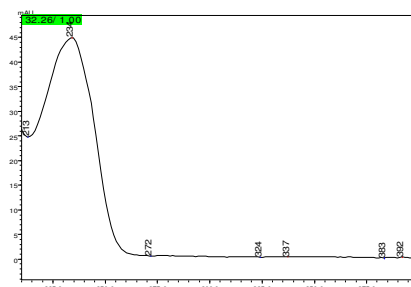


Figura 28. Espectro obtido no UV do produto de degradação da casearina J, pico em 23,5 min.

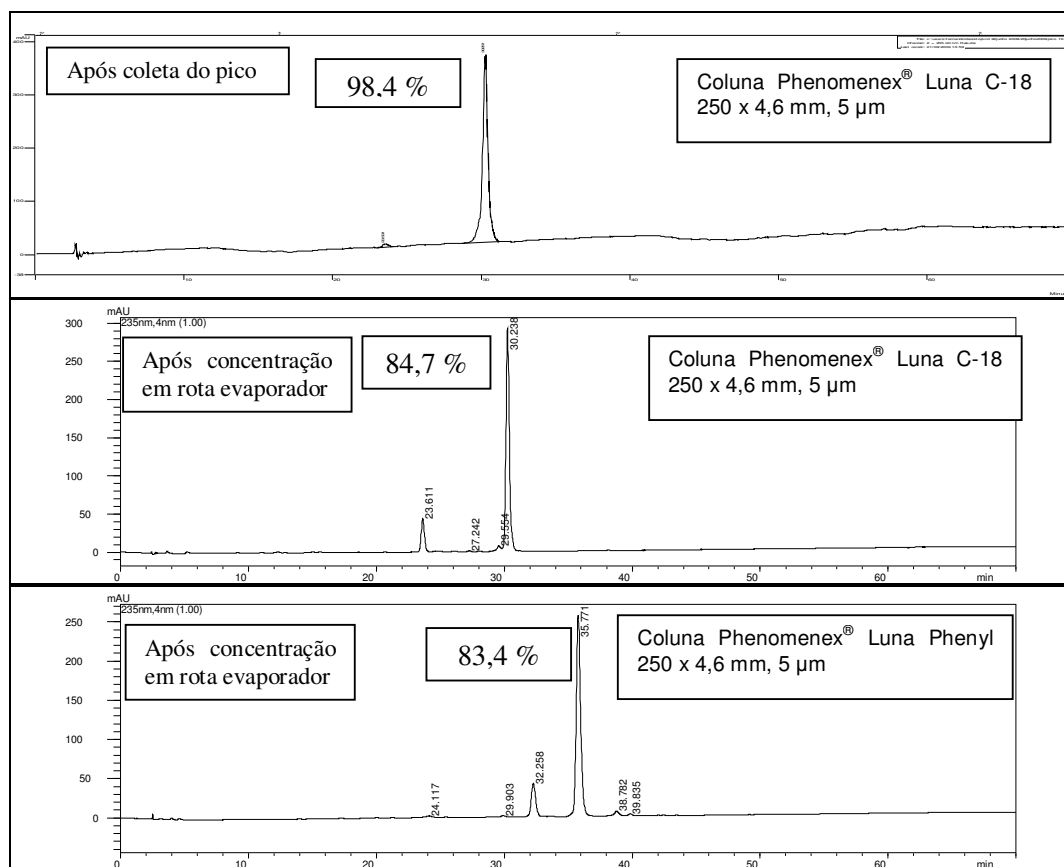


Figura 29. Pureza cromatográfica da casearina J determinada em coluna C18 após coleta do pico e em colunas C18 e fenil-hexil após evaporação total do solvente e dissolvido em MeOH, na concentração de 0,2 mg/mL, condição de análise no item 5.8.

A Figura 30 evidencia o alto grau de pureza cromatográfica para a casearina X, sendo 97 % em coluna C18 e 94 % em coluna fenil-hexil. Esta casearina é mais estável que a J, pois após concentração em rota evaporador a mesma não apresentou degradação significativa.

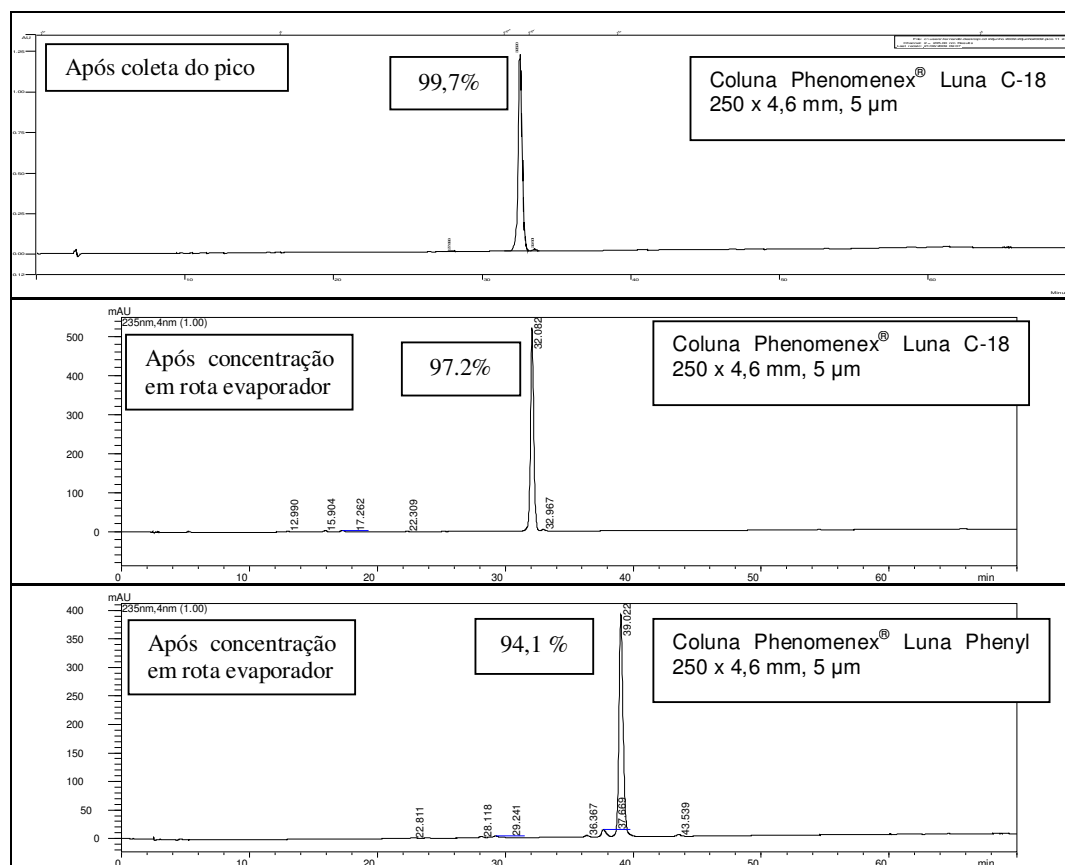


Figura 30. Pureza cromatográfica da casearina X determinada em coluna C18 após coleta do pico e em colunas C18 e fenil-hexil após evaporação total do solvente e dissolvido em MeOH, na concentração de 0,4 mg/mL, condição de análise no item 5.8.

Da mesma forma, a caseargrewiina F não apresentou degradação após concentração em rota evaporador, resultando em pureza cromatográfica maior que 98% nas duas colunas (Figura 31).

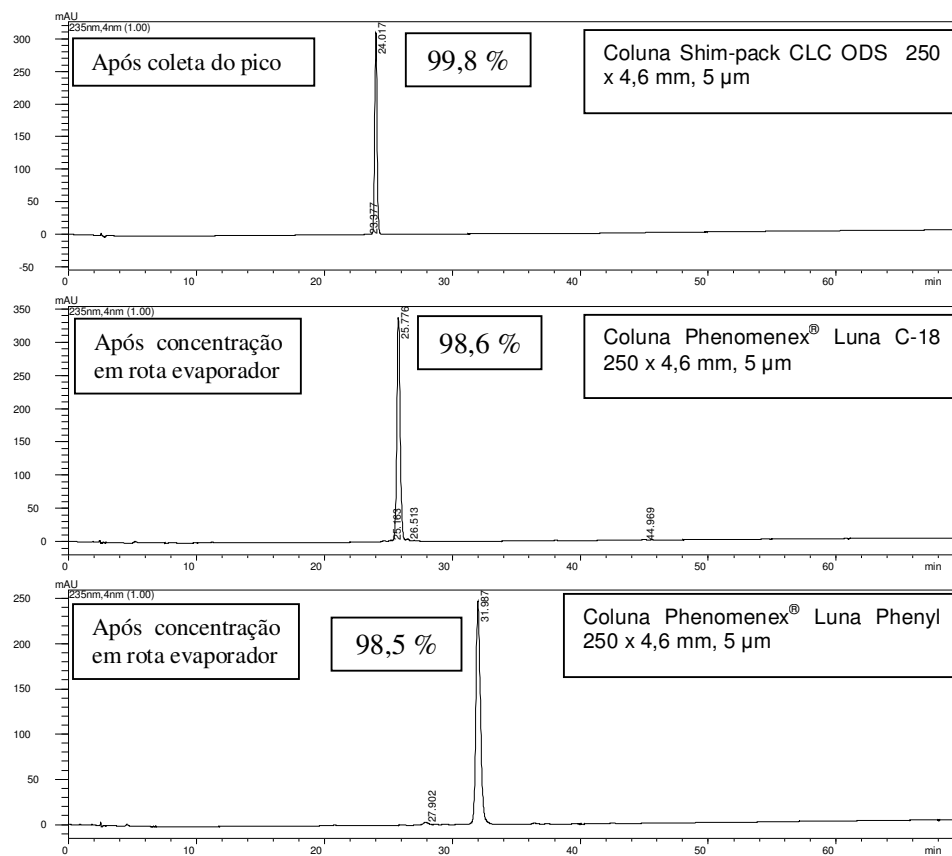


Figura 31. Pureza cromatográfica da caseargrewiina F determinada em coluna C18 após coleta do pico e em colunas C18 e fenil-hexil após evaporação total do solvente e dissolvido em MeOH, na concentração de 0,2 mg/mL, condição de análise no item 5.8.

6.6.2. CLAE-DAD-EM

As análises por CLAE-DAD-EM consistiram na verificação da presença de possíveis contaminantes co-eluindo com as substâncias purificadas, além de identificar as massas desses contaminantes pela análise dos seus espectros de massas.

As Figuras 32, 33 e 34 apresentam os resultados das análises por CLAE-DAD-EM em coluna C18 e fenil-hexil para as três casearinas analisadas. Foram obtidos os espectros de absorção no UV dos picos detectados nos cromatogramas abaixo (Anexos 47 a 53), sendo que praticamente todos os picos têm máximo de absorção no comprimento de onda de 235 nm. Estes resultados auxiliaram a confirmar os resultados obtidos pela pureza cromatográfica obtida no item 6.6.1., pois esses contaminantes respondem de forma semelhante no UV.

Em uma análise preliminar dos espectros de massas dos picos detectados após o processo de dessecamento do cromatograma da casearina J (Figura 32) alguns picos tem espectros com íons característicos de casearinas, pois estas apresentam o íon $[M+Na]^+$ e $[M+Na+51]^+$, apesar deste último íon ainda não ter sido interpretado de forma conclusiva por este grupo de pesquisa, mas está presente em todas as casearinas estudadas. Pode-se identificar a presença desses nos espectros de massas número, 5, 7, 8, 9, 10, 15, 17, 19, 21 em coluna fenil-hexil (Anexos 57 a 63). Em coluna C18 é observado esse mesmo perfil de íons nos espectros, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 16, 20 (Anexos 77 a 81).

Resultados semelhantes são apresentados para a casearina X, espectros de massas 11, 12, 13, 15, 19, 22, 25 e 28 em coluna fenil-hexil (Anexos 64 a 70) e 5, 8, 9, 10, 13, 15, 21 em coluna C18 (Anexos 83 a 85) e para caseargrewiina F, espectros 6, 10, 13 e 18 em coluna fenil-hexil (Anexos 71 a 76) e 4, 6 e 13 em coluna C18 (Anexos 86 a 90). Uma alternativa para identificar esses picos é fazer a fragmentação de cada um e, desta forma, obter o perfil de fragmentação.

Comparando os cromatogramas das três casearinas (Figuras 32, 33 e 34) é observado que elas são mais retidas em coluna fenil-hexil que em C18 e também apresentam picos co-eluindo com as substâncias. Desta forma, sugere-se que a coluna analítica C18 é mais adequada para o uso.

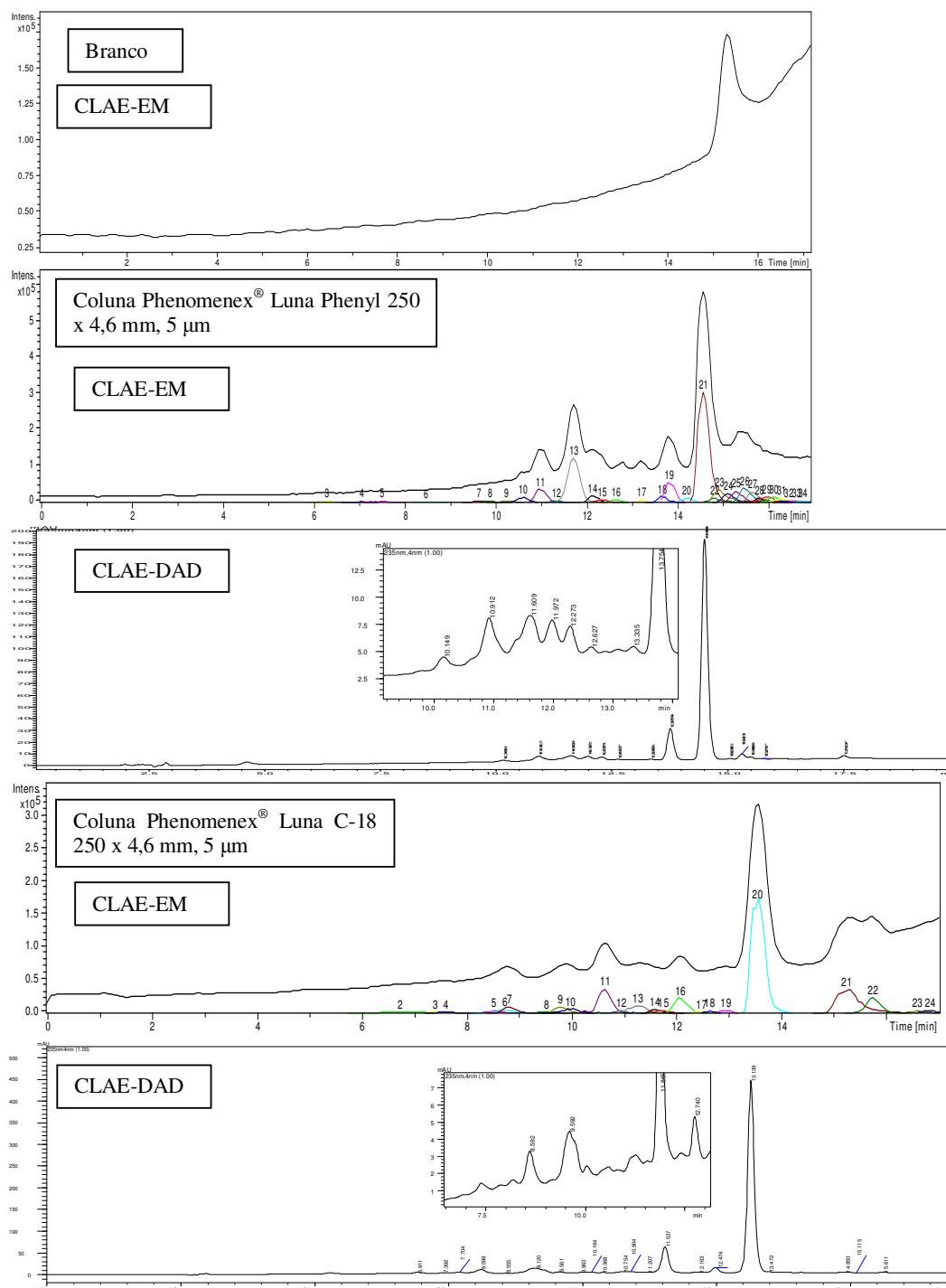


Figura 32. CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD branco e da casearina J em coluna fenil-hexil e C18, gradiente linear de H₂O/MeOH 35:65 à 00:100 em 15 min., mais 5 min condição final, também é mostrado a ampliação resultante da presença dos contaminantes.

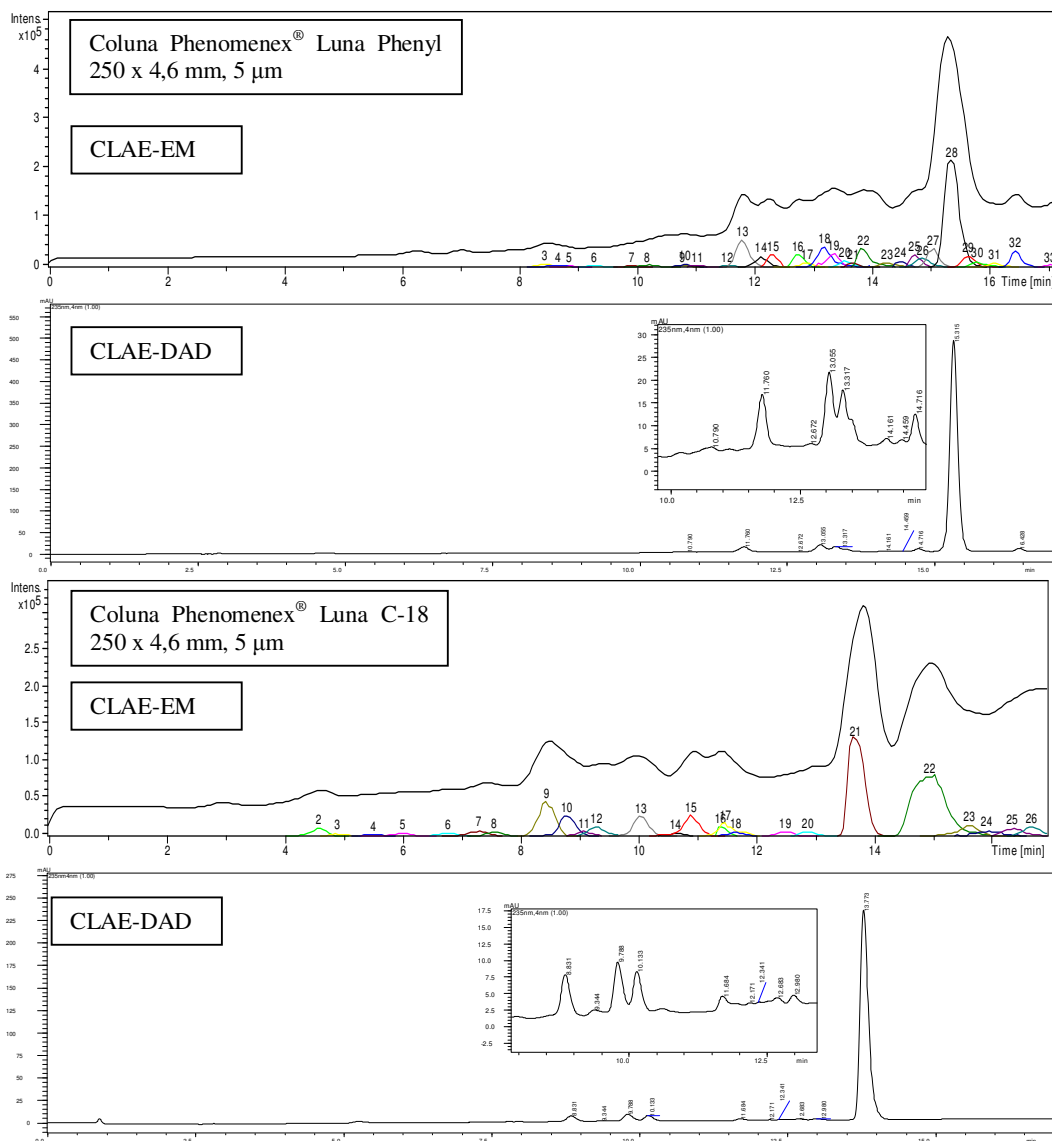


Figura 33. CLAE-DAD-EM da casearina X em coluna fenil-hexil e C18, gradiente linear de H₂O/MeOH 35:65 à 00:100 em 15 min, mais 5 min condição final, também é mostrado a ampliação resultante da presença dos contaminantes.

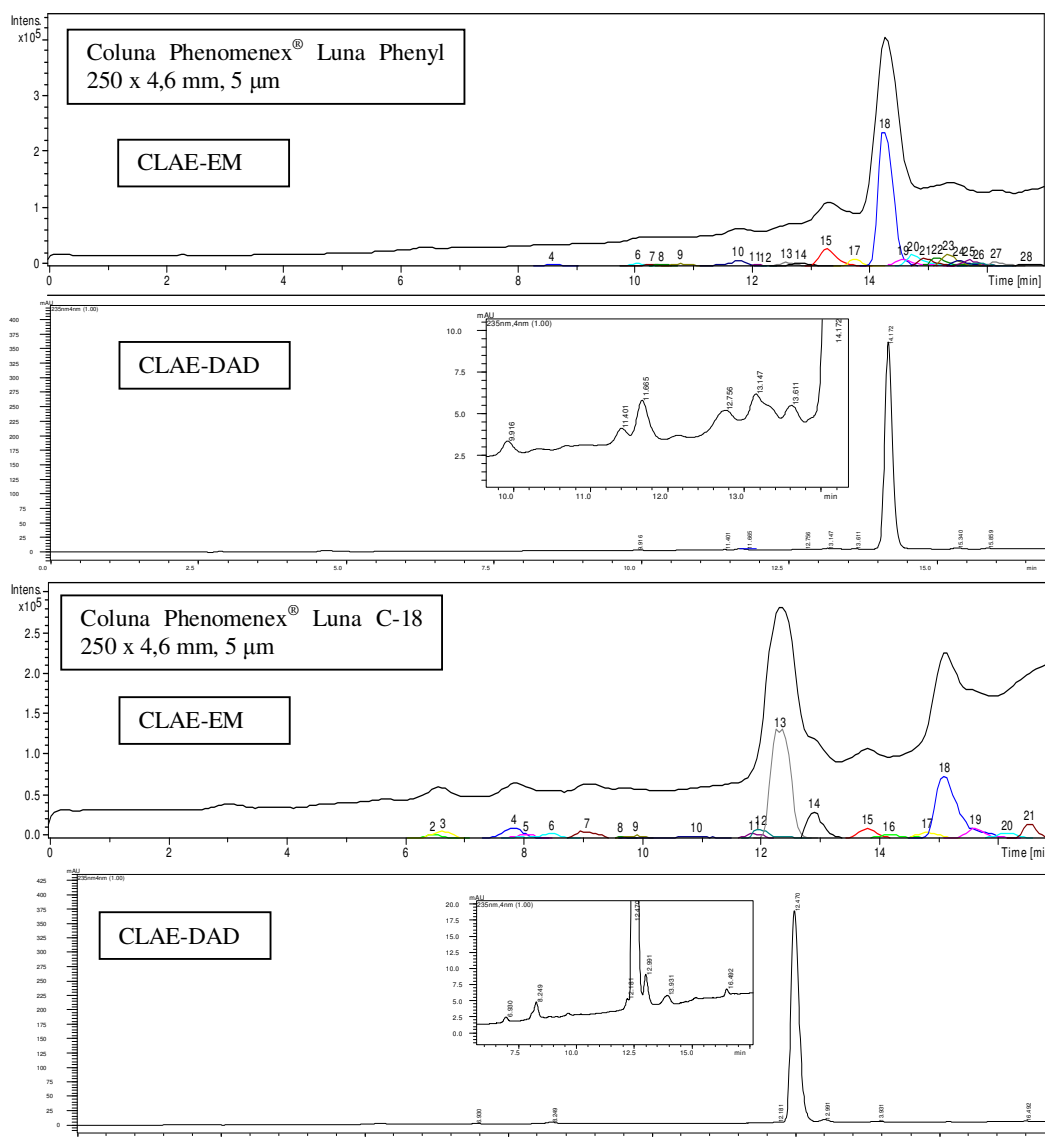


Figura 34. CLAE-DAD-EM da caseargreina F em coluna fenil-hexil e C18, gradiente linear de H₂O/MeOH 35:65 à 00:100 em 15 min., mais 5 min condição final, também é mostrado a ampliação resultante da presença dos contaminantes.

6.6.3. Análise térmica

A natureza da mudança de posição da linha de base observada em uma curva DSC quando uma substância sofre transição vítrea reside na variação finita da capacidade calorífica inerente a essa transição. Esse fenômeno é observado para a caseargrewiina F (Figura 35), sendo que as temperaturas referentes a essa transição são: $T_{on\ set} = 53,9\ ^\circ\text{C}$, $T_g = 56,1\ ^\circ\text{C}$ e $T_{g\ médio} = 56,3\ ^\circ\text{C}$. A transição só ocorre em materiais não cristalinos (comumente chamados de amorfos), desta forma não apresentando pico de fusão. Neste caso, não foi possível calcular a pureza dessa substância por esta técnica por ela não apresentar pico referente à fusão no experimento de ponto de fusão, mas sim uma faixa de temperatura, muitas vezes confundida com o ponto de fusão da substância.

Mecanicamente, a partir da temperatura de transição vítrea, o material migra de um estado rígido e quebradiço denominado vítreo para um estado borrachoso, de maior mobilidade molecular. As mudanças observadas não ocorrem em uma temperatura específica, como é o caso do processo de fusão, mas em uma faixa de temperatura, o que leva alguns autores a sugerirem que a melhor denominação para a temperatura de transição vítrea seria intervalo de temperatura de transformação vítrea (YAMAKI; PEDROSO; ATVAR, 2002).

A curva TG da caseargrewiina F, em atmosfera dinâmica de ar, apresenta dois eventos de decomposição. No primeiro evento ocorre perda de 46,4 % de massa e, no segundo evento, a perda de massa é de 53,6 %. Estes eventos são confirmados pela curva DTG. Essa segunda perda de massa, referente à oxidação da substância e divide-se em pelo menos dois eventos que não puderam ser resolvidos pela curva TG (Figura 36 e Tabela 12).

A curva DTA (Figura 36) apresenta um pico exotérmico, 421,3 – 590,1 $^\circ\text{C}$, referente à oxidação, confirmada pela perda total de massa apresentada pela curva TG.

Além dessa perda, pode-se sugerir a ausência de contaminantes voláteis e de água na amostra, pois a mesma não apresentou perda significativa de massa na região de 30 a 100 $^\circ\text{C}$, referente à faixa de evaporação dos solventes orgânicos e água utilizados nas etapas de purificação.

O experimento de resíduo de cinzas também foi realizado por TG. Como resultado não apresentou massa significativa após 1000 $^\circ\text{C}$, sugere-se a ausência de cinzas (quantidade não detectável). Este resultado já era esperado, pois a amostra sofre diversos fracionamentos e no isolamento em CLAE preparativa é utilizada água e solventes orgânicos de alta pureza para obtenção dessa substância. Esse mesmo resultado é igual para a casearina J e casearina X.

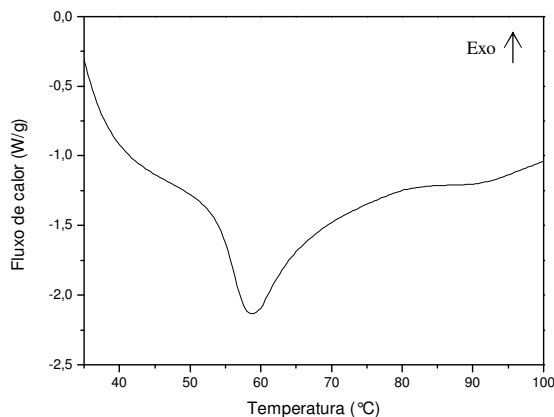


Figura 35. Curva DSC para a caseargreina F apresentando a região referente à transição vítrea (razão de aquecimento de 20 °C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético, cadinho de alumínio).

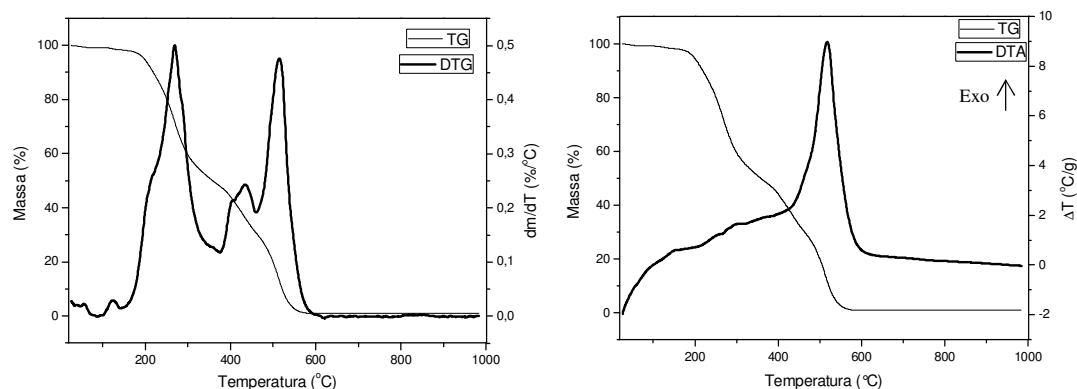


Figura 36. Curva TG/DTG e TG/DTA para a caseargreina F (razão de aquecimento 20 °C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético, cadinho de alumina).

Tabela 12. Características termogravimétricas da caseargreina F em atmosfera dinâmica de ar sintético e razão de aquecimento de 20 °C/ min

Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)
164,7 – 331,2	46,4
331,2 – 584,7	53,6

As curvas DSC para a casearina J e casearina X não são apresentadas por não apresentarem informações que possam contribuir para este trabalho, pois não apresentaram pico de fusão para cálculo de pureza e nem a transição vítrea, mas de maneira similar à caseargreina F, estas substâncias apresentaram uma faixa de temperatura da passagem de sólido para “líquido” quando realizado o experimento de ponto de fusão.

A curva TG da casearina J (Figura 37) em atmosfera dinâmica de ar sintético revela dois eventos de decomposição, com uma primeira perda de massa de 52,4 % e uma segunda

de 47,6 % (Tabela 13). A curva DTG apresenta dois eventos para o primeiro estágio de decomposição.

A curva DTA (Figura 37) apresenta um pico exotérmico, entre 429,2 – 607,6 °C, referente à oxidação da matéria orgânica.

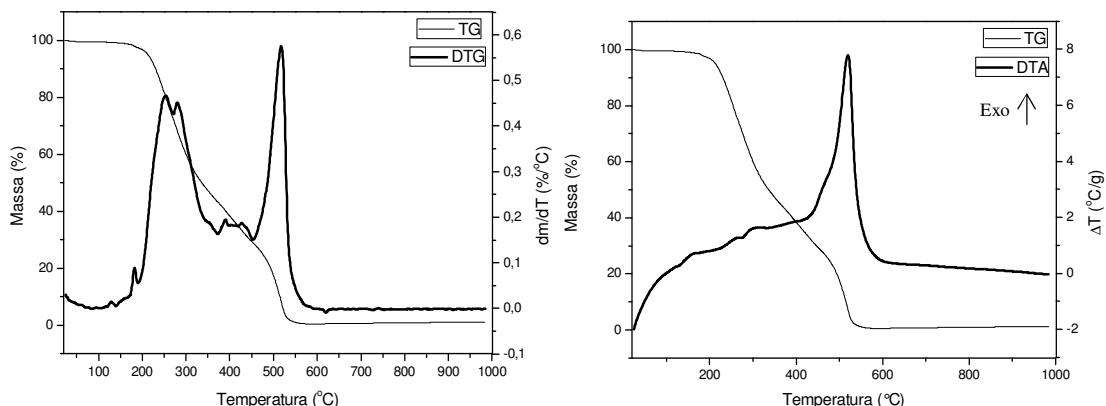


Figura 37. Curva TG/DTG e TG/DTA para a casearina J (razão de aquecimento de 20 °C/min em atmosfera dinâmica de ar sintético, cadinho de alumina).

Tabela 13. Características termogravimétricas da casearina J em atmosfera dinâmica de ar sintético e razão de aquecimento de 20 °C/ min.

Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)
169,7 – 341,3	52,4
341,3 – 560,4	47,6

A curva TG da casearina X (Figura 38) em atmosfera dinâmica de ar revela dois eventos de decomposição, uma primeira perda de massa de 44,3 % e uma segunda de 55,7 % (Tabela 14). A curva DTG, apresenta a ocorrência de duas decomposições para o primeiro evento e três decomposições para o segundo evento.

A curva DTA (Figura 38), apresenta um primeiro eventos exotérmico, entre 130,5-188,1 °C e mais dois referentes à oxidação total da substância, entre 422,0 – 607,6 °C.

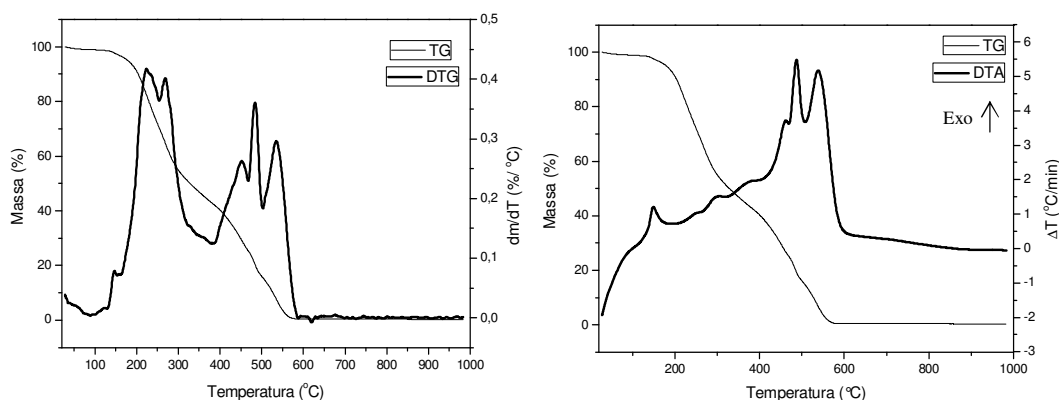


Figura 38. Curva TG/DTG e TG/DTA para a casearina X (razão de aquecimento 20 °C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético, cadinho de alumina).

Tabela 14. Características termogravimétricas da casearina X em atmosfera dinâmica de ar sintético e razão de aquecimento de 20 °C/ min.

Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)
169,7 – 296,4	44,3
296,4 – 584,6	55,7

6.6.4. Análise elementar

A seguir são apresentados os resultados de análise elementar (Tabela 15). Todas as amostras apresentam valores das porcentagens de carbono e hidrogênio fora do erro da análise, sendo encontradas as seguintes fórmulas moleculares: casearina J $C_{31}H_{44}O_9$, casearina X $C_{29}H_{42}O_8$ e caseargrewiina F $C_{28}H_{44}O_8$.

Estes resultados sugerem uma possível contaminação dessas substâncias, mas os espectros de RMN de 1H e ^{13}C das casearinas X e caseargrewiina F não apresentam sinais que possam ser de outras substâncias orgânicas ou mesmo casearinas. Já a casearina J apresenta alguns sinais que não referentes à substância em seus espectros de RMN de 1H e ^{13}C (Anexos 2 a 5). Este comportamento já era esperado para esta substância, já que por CLAE-DAD, foi verificada a modificação molecular sem perda do grupo funcional. O isolamento dessa, e sua identificação, possibilitaria interpretar corretamente a presença dos sinais não correspondentes à casearina J nos espectros de RMN, mas com menor intensidade. A análise TG demonstra a ausência de cinzas, que poderiam estar influenciando nesta análise.

Tabela 15. Resultados da análise elementar para as casearinas J, X e caseargrewiina F.

Substâncias	Formula Molecular	Porcentagem Teórica		Porcentagem Experimental		Erro 0,2 % análise
		C (%)	H (%)	C (%)	H (%)	Erro no C
Casearina J	$C_{31}H_{46}O_9$	66,15	8,18	66,58	7,81	0,7
Casearina X	$C_{30}H_{44}O_8$	67,63	8,27	67,28	8,07	0,5
Caseargrewiina F	$C_{28}H_{40}O_8$	66,63	7,93	65,93	8,68	1,0

6.6.5. Cálculo da pureza

Segundo The Directorate for... (2007) apud Ma et al. (2009); World Health Organization (2003) apud Ma et al. (2009), a porcentagem de pureza de um material pode ser obtido calculando-se a pureza por métodos relativos subtraindo desse valor a porcentagem de constituintes voláteis, umidade e cinzas.

$$\text{Pureza} = (\text{Pureza relativa\%} - \text{impurezas voláteis\%} - \text{teor de umidade\%} - \text{cinzas\%})$$

Como a presença de contaminantes voláteis e cinzas não foram detectáveis pelas técnicas utilizadas, a pureza das substâncias isoladas é igual à pureza relativa obtida por CLAE-DAD.

Para a casearina J a pureza em coluna C18 é:

$$\text{Pureza} = (85,5 - 0 - 0 - 0) \rightarrow \text{Pureza} = 85,5 \%$$

A tabela a seguir mostra os resultados do cálculo de pureza para as três casearinas estudadas e em suas respectivas colunas C18 e Fenil-Hexil.

Tabela 16. Resultado de pureza para as casearinas isoladas de *Casearia sylvestris*.

Casearina J		Casearina X		Caseargreuiina F	
C18 (%)	Fenil-Hexil (%)	C18 (%)	Fenil-Hexil (%)	C18 (%)	Fenil-Hexil (%)
85,5	83,4	97,2	94,1	98,6	98,5

7. Conclusão

Levando-se em consideração que o desenvolvimento de método cromatográfico em CLAE preparativo é uma etapa importante no isolamento e purificação de metabólitos secundários de plantas visando a obtenção das substâncias com maior porcentagem de pureza para a realização de ensaios biológicos e/ou para serem utilizadas como padrão no controle de qualidade, os dois métodos apresentados em CLAE preparativo em fase reversa no modo isocrático e reciclante foram satisfatórios para obtenção das casearinas a partir de *Casearia sylvestris*. Ressalta-se que no modo reciclante existe a possibilidade de injetar grandes quantidades de amostra e o consumo de solvente é menor.

As substâncias isoladas foram identificadas como casearina J, X e caseargrewiina F, além de uma inédita nomeada casearina Z. O isolamento dessa última casearina demonstra o ótimo desempenho do método no modo isocrático, pois foi possível isolar e identificar uma substância nova.

Foram utilizadas as casearinas J, X e caseargrewiina F no estudo de pureza empregando-se de diferentes técnicas para a avaliação dessa pureza. O método cromatográfico por CLAE-DAD com o uso de colunas com diferentes seletividades e os cálculos de pureza de pico e pureza cromatográfica pelo método de normalização de área, mostraram-se eficazes para aferir os valores de porcentagem de pureza dessas casearinas, sendo, desta forma, utilizado como técnica padrão para determinação da pureza, já que o detector de DAD é seletivo para as casearinas e os contaminantes presentes também absorvem na mesma região do espectro de absorção no UV.

A CLAE-DAD-EM foi utilizada para auxiliar na identificação das substâncias e também na verificação de possíveis contaminantes co-eluído com as casearinas isoladas. Os resultados apresentados foram consistentes com as massas moleculares dessas, além da detecção das massas dos contaminantes nos respectivos cromatogramas. Alguns picos apresentam o mesmo padrão de ionização das casearinas já estudadas, no entanto, esses não puderam ser identificados até o momento, pois não foi possível atribuir o perfil de fragmentação a nenhuma substância.

A determinação de pureza por DSC não foi possível, pois as substâncias não apresentaram pico referente à fusão em seus termogramas, sugerindo um estado não cristalino para estas casearinas, como o apresentado para a caseargrewiina F. As curvas TG/DTG/DTA

auxiliaram na caracterização de solventes residuais, água e cinzas totais, além de um estudo preliminar da decomposição dessas substâncias.

A comparação das fórmulas percentual experimental e teórica indicou diferença acima do erro experimental aceitável (0,2%) para a análise elementar, desta forma não sendo conclusivo quanto à presença de contaminantes que não sejam detectados nas outras técnicas, pois analisando os espectros de RMN e as curvas TG a CLAE-DAD e CLAE-EM, é possível sugerir a ausência de contaminantes orgânicos voláteis, cinzas e a presença de picos nos cromatogramas são referentes a degradação das casearinas estudadas.

Deve-se ressaltar que é necessária uma grande quantidade de substância para a realização de todas as análises, por isso, muitas vezes é inviável a aplicação de algumas técnicas destrutivas de análise, sendo assim necessária a utilização de salas limpas, vidrarias e todo material deve ser de uso exclusivo para este tipo de trabalho e talvez até a utilização de equipamento com a mesma finalidade.

Desta forma, neste trabalho de mestrado foi possível a aplicação de algumas técnicas utilizadas rotineiramente em diversos laboratórios, permitindo o isolamento, identificação e caracterização da pureza das casearinas como padrões. Assim, a utilização de CLAE-DAD e CLAE-EM, RMN e técnicas térmicas é uma boa estratégia para a caracterização dessas casearinas.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Orientações sobre controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2008a.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>>. Acesso em: 10 mar. 2008b.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132>. Acesso em: 10 mar. 2008c.
- ARAGÃO, C. F. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; MACÊDO, R. O. Thermal characterization of warifteine by means of TG and a DSC photovisual system. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 64, p. 185-191, 2001.
- BANDEIRA, K. F.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. da S.; CAVALHEIRO, A. J. Optimisation of conditions for the extraction of casearins from *Casearia sylvestris* using response surface methodology. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 168-175, 2006.
- BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 185-97, 1990.
- BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSHECHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863-1869, 2001.
- BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, p. 21-31, 2000.
- BRADSHAW, J.; BUTINA, D.; DUNN, A. J.; GREEN, R. H.; HAJEK, M.; JONES, M. M.; LINDON, J. C.; SIDEBOTTOM, P. J. A rapid and facile method for the dereplication of purified natural products. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1541-1544, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Fitoterapia**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=29276&janela=2>. Acesso em: 2 dez. 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>> Acesso em: 21 nov. 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas_medicinais.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2009c.

BRYANT, D. K.; KINGSWOOD, M. D.; MELENGUER, A. Determination of liquid chromatographic peak purity by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 721, p. 41-51, 1996.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58-S65, 2000.

CARVALHO, P. R. F. de; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. da S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CESCHEL, G. C.; BADIELLO, R.; RONCHI, C.; MAFFEI, P. Degradation of components in drug formulations: a comparison between HPLC and DSC methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1067-1072, 2003.

CHEN, B.; SHEN, X.; KONG, J. Determining the purity of samples from natural products by coupling HPLC and CCD spectrometry. **Journal Separation Science**, v. 28, p. 286-290, 2005.

ESTEVEZ, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

FRANCISCHINELLI, M. C.; SILVA, M. G.; ANDREO FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; LEITE, G. B.; HÖFLING, M. A. C.; SIMIONI, L. R.; FRANCO, Y. O. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 784-790, 2008.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (Brasil). J. A. A. Sertié; R. G. Woisky; A. J. Cavalheiro; V. da S. Bolzani; A. G. dos Santos; A. G. Tininis. **Processo de obtenção de extratos de *Casearia sylvestris*, processos de obtenção de frações ativas, extratos, frações ativas, uso de extratos e frações ativas, composição, unidade de dosagem, método para prevenir, tratar, combater ou suspender distúrbios gastrintestinais, medicamento e princípio ativo**. BR 2003006167, 18 Dez. 2003, 30 Ago. 2005.

INSTITUTO DE PESOS E MEDIDAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Padrões**. Disponível em: <<http://www.ipem.sp.gov.br/5mt/met-geral.asp?vpro=padrao>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Comitê brasileiro de metrologia**: diretrizes estratégicas para a metrologia brasileira, INMETRO. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/dirEstrategica/diretrizesEstrategicas_11_02_2003.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2008a.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **A metrologia química no INMETRO**. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/metQuimica.asp>>. Acesso em: 10 mar. 2008b.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Equipe de metrologia em química orgânica**. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/quimica/organica.asp>>. Acesso em: 10 mar. 2008c.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* SW. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 4, p. 1585-1588, 1988.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3384-3388, 1990.

JIN, Y.; XUE, X.; LIU, Y.; XIAO, Y.; ZHANG, J.; SHI, H.; ZHANG, F.; LIANG, X. A novel method of prediction and optimization for preparative high-performance liquid chromatography separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1183, p. 76-86, 2008.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; BUAYAIRAKSA, M. Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiaefolia*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 7, p. 1122-1126, 2007.

KLUG, M.; SANCHES, M. N. M.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; RODRIGUES, C. A. Análise das isotermas de adsorção de Cu(II), Cd(II), Ni(II) e Zn(II) pela n-(3,4-dihidroxibenzil) quitosana empregando o método da regressão não linear. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 410-414, 1998.

KNOX, H.; PYPER, H. M. Framework for maximizing throughput in preparative liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 366, n. 1, p. 1-30, 1986.

LEE, Y. W.; JIN, Y.; ROW, K. H. Extraction and purification of eupatilin from *Artemisia princeps* PAMPAN recycling preparative HPLC. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 2, p. 279-282, 2006.

LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHANC, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.

LIU, C.; HAN, J.; DUAN, Y.; HUANG, X.; WANG, H. Purification and quantification of ginsenoside Rb3 and Rc from crude extracts of caudexes and leaves of *Panax notoginseng*. **Separation and Purification Technology**, v. 54, p. 198-203, 2007.

MA, A. K.; WANGA, H.; ZHAOA, M.; XING, J. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high-performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 650, p. 227-233, 2009.

MACÊDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G. do; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Application of thermal analysis in the characterization of anti-hypertensive drugs. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 59, p. 657-661, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-428, 2002.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 337-342, 2004.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693-697, 1991.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OLIVEIRA, A. M. de; SANTOS, A. G. dos; SANTOS, R. A. dos; CSIPAK, A. R.; OLIVATO, C.; SILVA, I. C. da; FREITAS, M. B. de; BASSI, C. L.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S.; SILVA, D. H. S.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S.; SOARES, C. P. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, v. 24, n. 6, p. 501-506, 2009.

PAPADOYANNIS, I. N.; GIKA, H. G. Peak purity determination with a diode array detector. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 6, p. 1083-1092, 2004.

O PAPEL dos padrões químicos de referência como instrumentos analíticos no estabelecimento da qualidade de materiais botânicos: uma perspectiva européia. **Folha Medicinal Online**: Informativo Eletrônico do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais, v. 1, n. 2, 2008. Disponível em: <<http://www.ibpm.org.br/p&d.shtml>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

PAUWELS, J.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A. Criteria for the certification of internationally acceptable reference materials. **Clinical Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 437-439, 1998.

SANTOS, A. G. dos. **Desenvolvimento de metodologia para a análise de variabilidade intra-específica e dinâmica de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae).** Dissertação. 120 f. (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

SANTOS, A. G. dos. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*:** contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico. 2008. 335 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SANTOS, A. G. dos; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. da S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SANTOS, A. G. dos; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. da S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. do Ó; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry and Diversity**, 2010. In press.

SANTOS, Z. M. dos; CARONI, A. L. P. F.; PEREIRA, M. R.; SILVA, D. R. da; FONSECA, J. L. C. Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 2591-2595, 2009.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 112-119, 2000.

SILVA, S. L. da; CHAAR, J. da S.; FIGUEIREDO, P. de M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SILVA, S. L. da; CHAAR, J. da S.; DAMICO, D. C. S.; FIGUEIREDO, P. de M. S.; YANO, T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 347-351, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIRMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. Cap. 31, p. 704-714.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 1997. p. 53-56; 616-640.

STEAD, P. Isolation by preparative HPLC. In: CANNELL, R. J. P. **Natural products isolation**. Totowa: Humana Press, 1998. v. 1, cap. 6, p. 165-166.

TAKETA, A. T. C.; LOZADA-LECHUGA, J.; FRAGOSO-SERRANO, M.; VILLARREAL, M. L.; PEREDA-MIRANDA, R. Isolation of Nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 644-649, 2004.

TININIS, A. G. **Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw.** 2006. 182 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006.

TRAPMANN, S.; SCHIMMEL, H.; KRAMER, G. N. Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organism. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 3, p. 755-799, 2002.

UNITED STATES of AMERICA. Food and Drug Administration. **Guidance for industry:** analytical procedures and methods validation- chemistry, manufacturing, and controls documentation. 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122858.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

WIBERG, K.; ANDERSSON, M.; HAGMAN, A.; JACOBSSON, S. P. Peak purity determination with principal component analysis of high-performance liquid chromatography–diode array detection data. **Journal of Chromatography A**, v. 1029, p. 13-20, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

WU, D-R.; LOHSE, K.; GREENBLATT, H. C. Preparative separation of taxol in normal- and reversed-phase operation. **Journal of Chromatography A**, v. 702, p. 233-241, 1995.

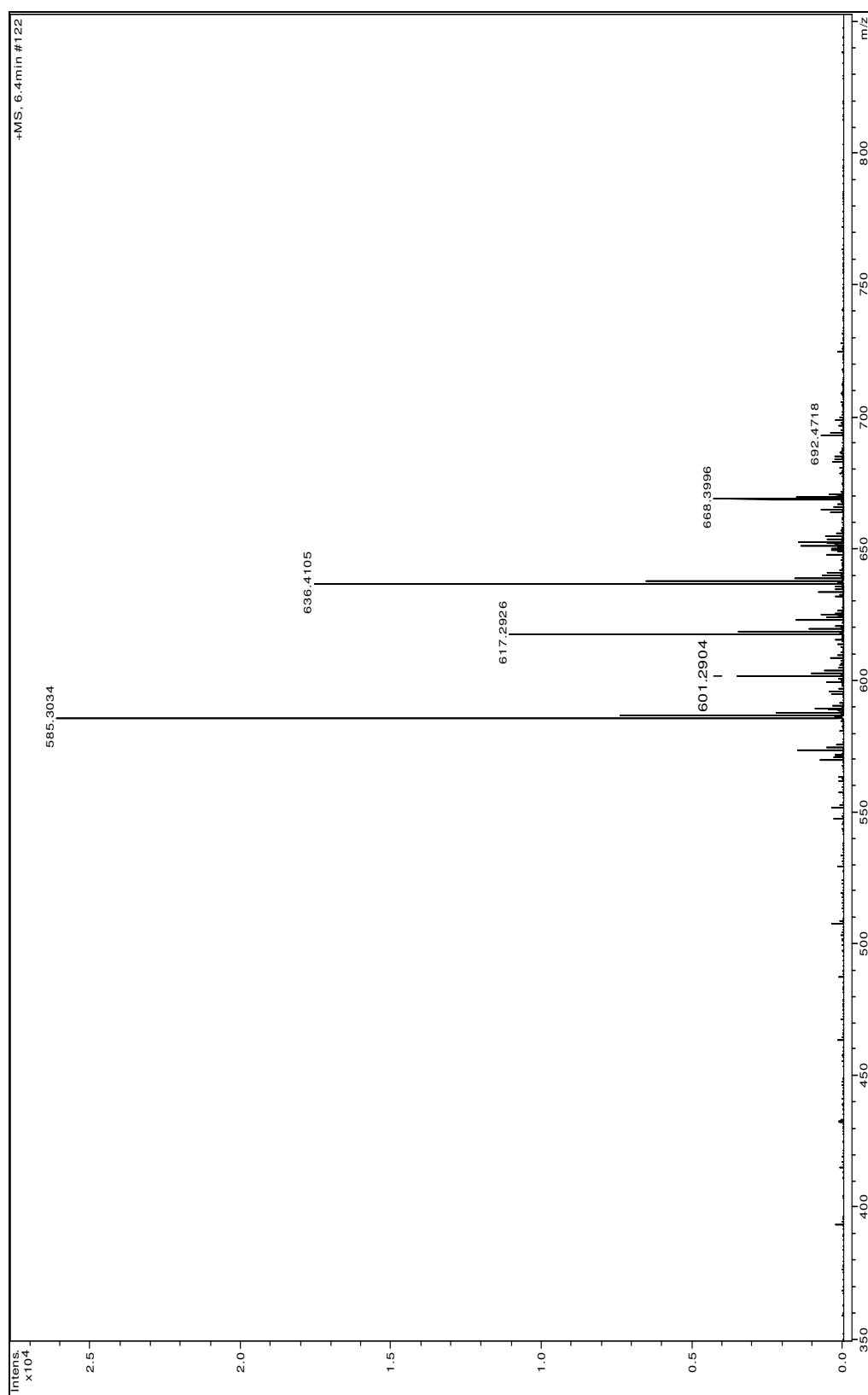
YAMASHITA, C. I.; SAIKI, M.; VASCONCELLOS, M. B. A.; SERTIÉ, J. A. A. Characterization of trace elements in *Casearia* medicinal plant by neutron activation analysis. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 63, p. 841-846, 2005.

YASUEDA, S.; HIGASHIYAMA, M.; SHIRASAKI, Y.; INADA, K.; OHTORI, A. An HPLC method to evaluate purity of a steroidal drug, loteprednol etabonate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 309-316, 2004.

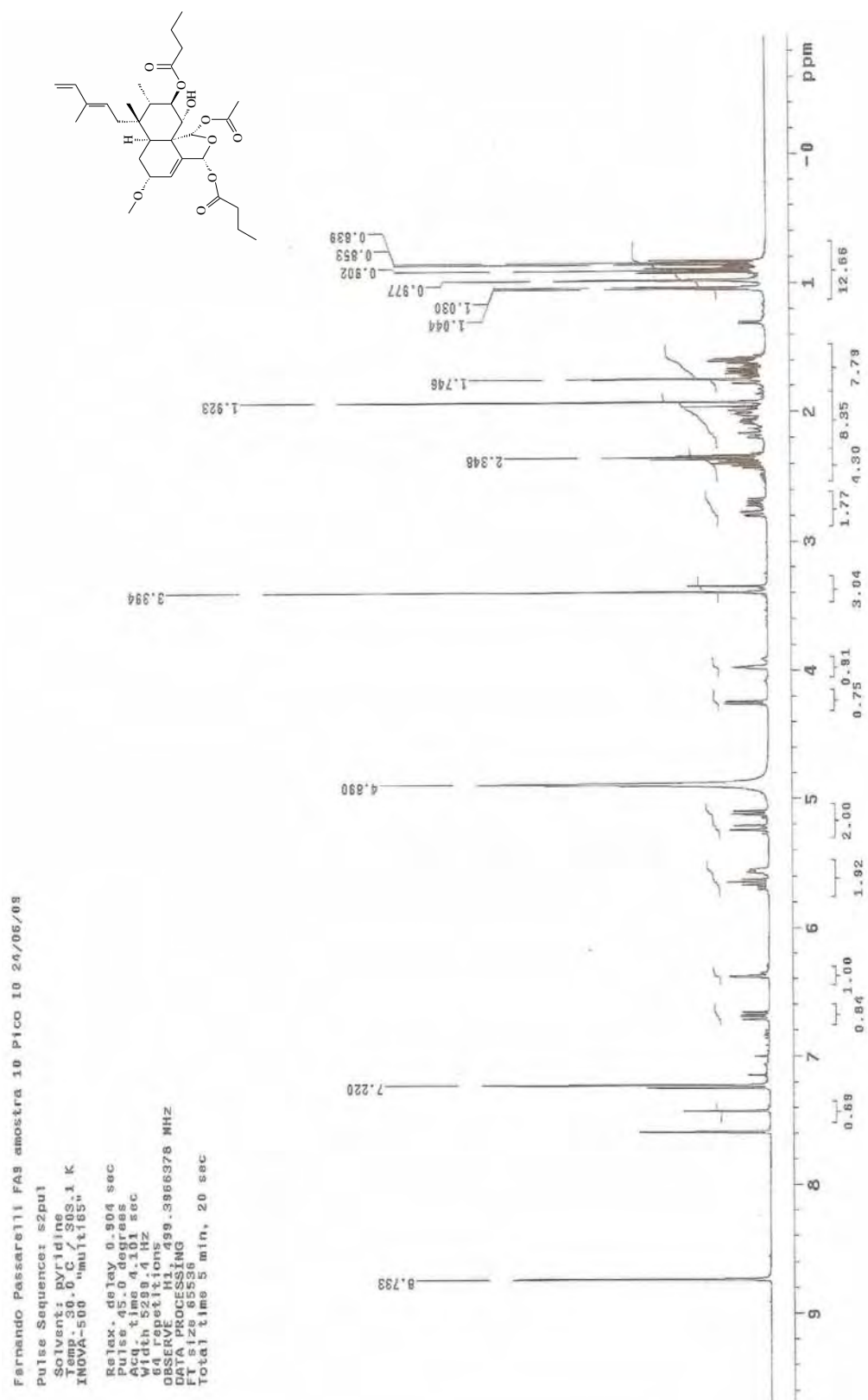
ZHANG, Y.; JIAO, J.; LIU, C.; WU, X.; ZHANG, Y. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1326-1336, 2008.

ZHOU, T.; ZHAO, W.; FAN, G.; CHAI, Y.; WU, Y. Isolation and purification of iridoid glycosides from *Gardenia jasminoides* Ellis by isocratic reversed-phase two-dimensional preparative high-performance liquid chromatography with column switch technology. **Journal of Chromatography B**, v. 858, p. 296-301, 2007.

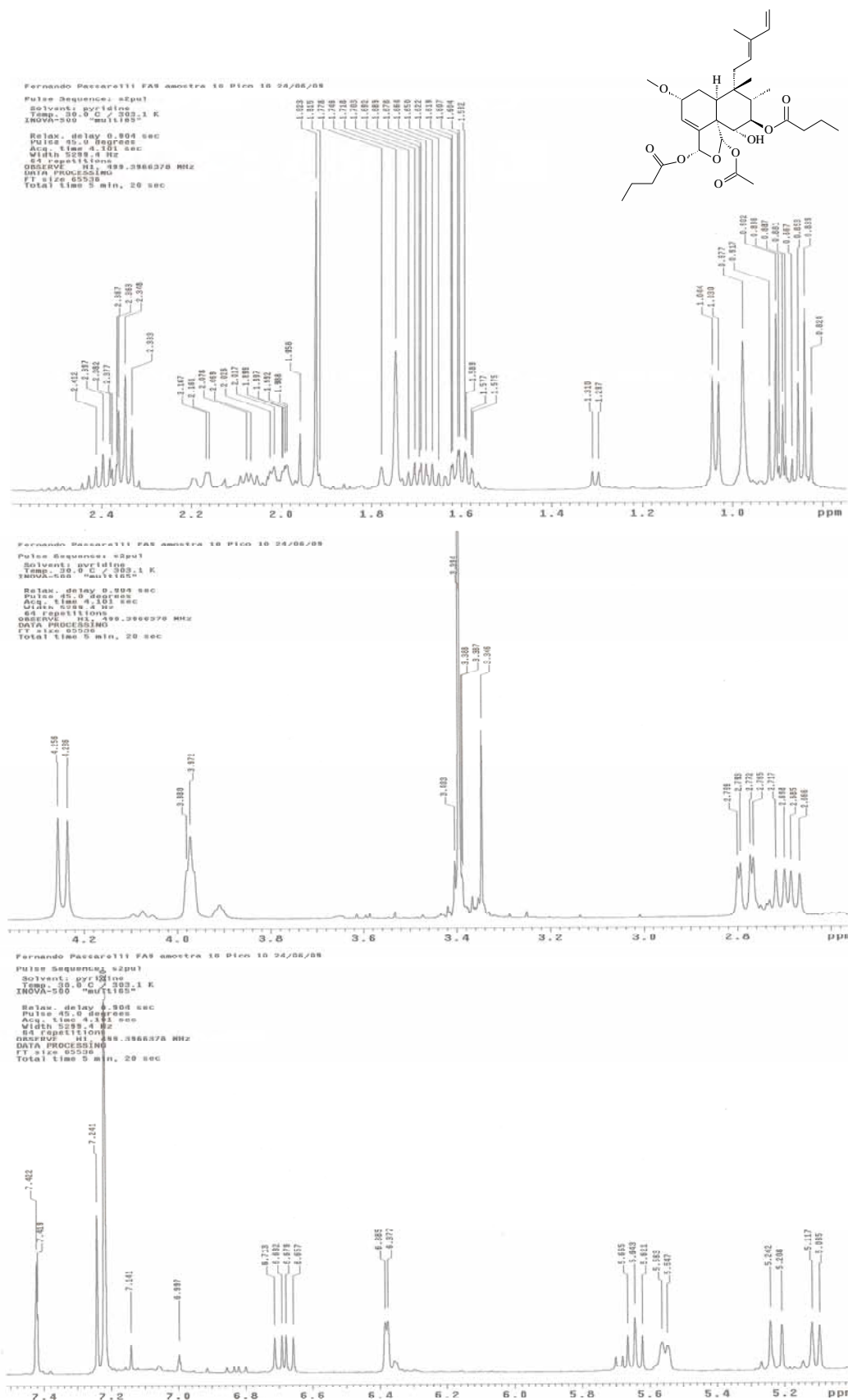
ANEXOS



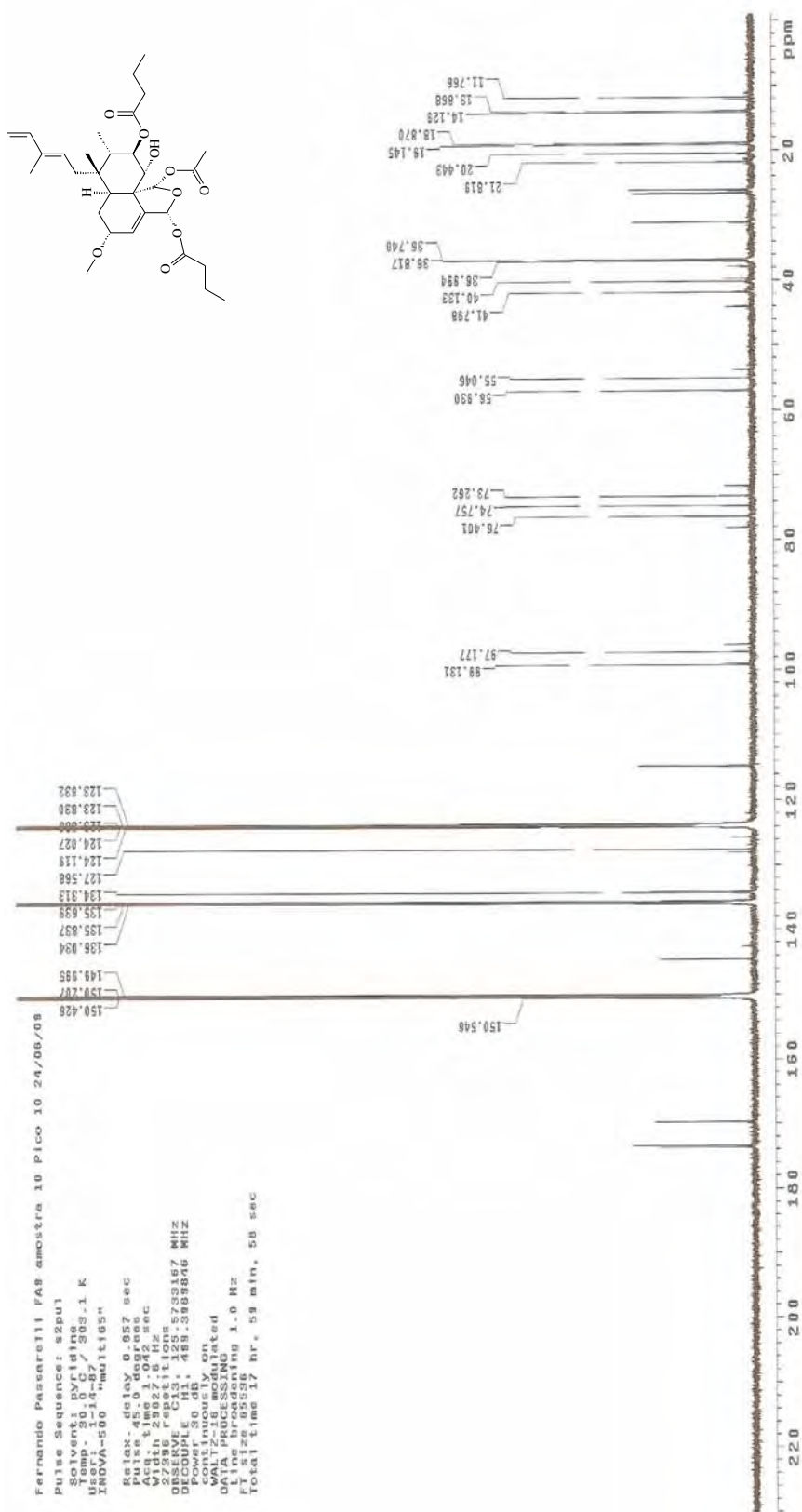
Anexo 1. Espectro de massas de alta resolução (HRTOF-ESIMS) da casearina J.



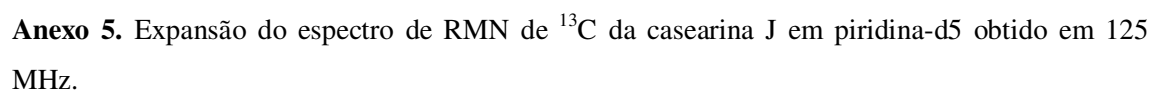
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H da casearina J em piridina- d_5 obtido em 500 MHz.

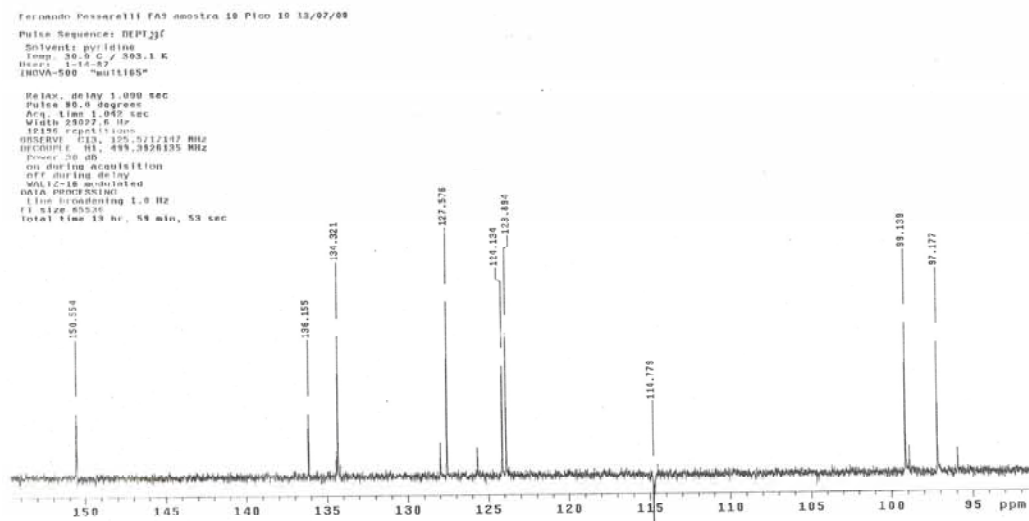
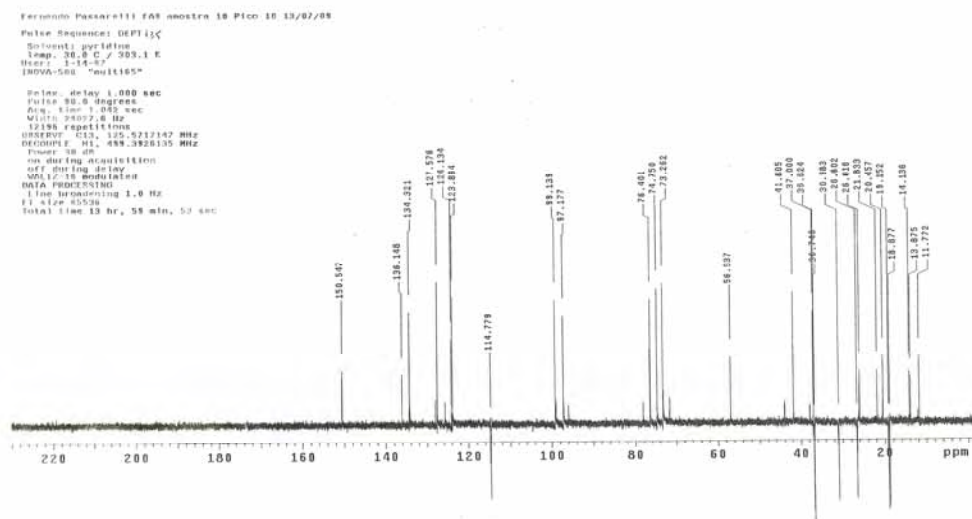
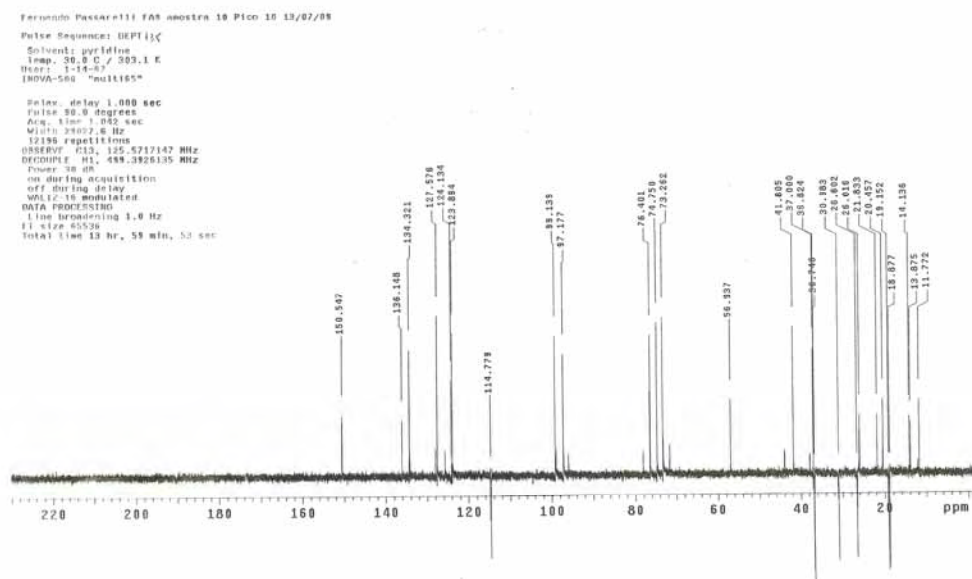


Anexo 3. Expansão do espectro de RMN de ^1H da casearina J em piridina- d_5 obtido em 500 MHz.

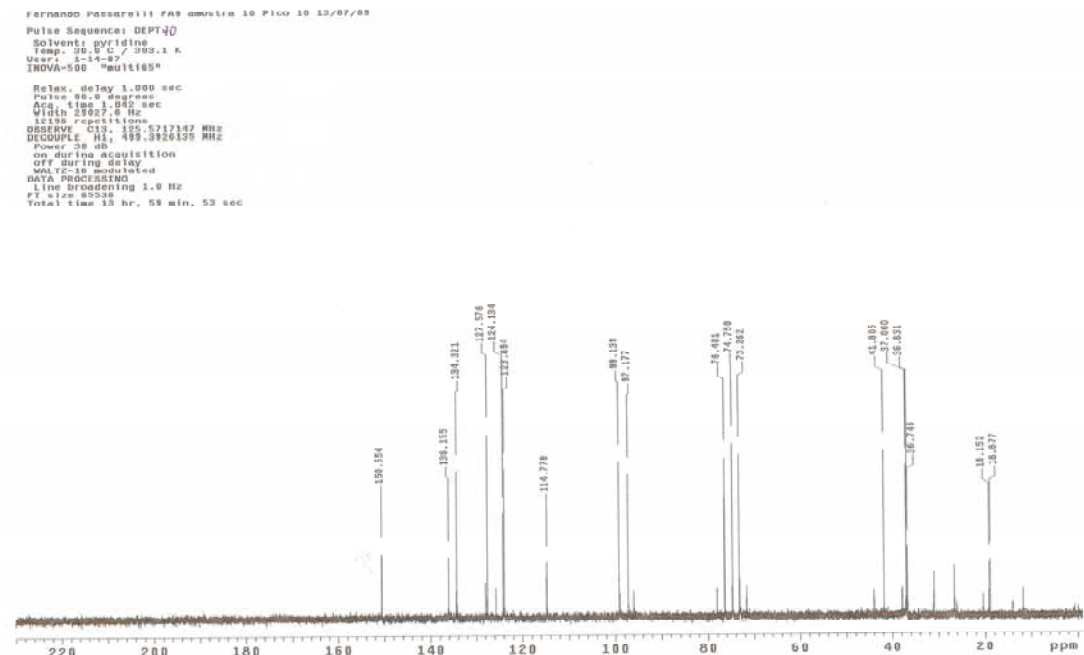


Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C da casearina J em piridina- d_5 obtido em 125 MHz.





Anexo 6. Espectro de DEPT 135° da casearina J em piridina-d5 obtido em 125 MHz.

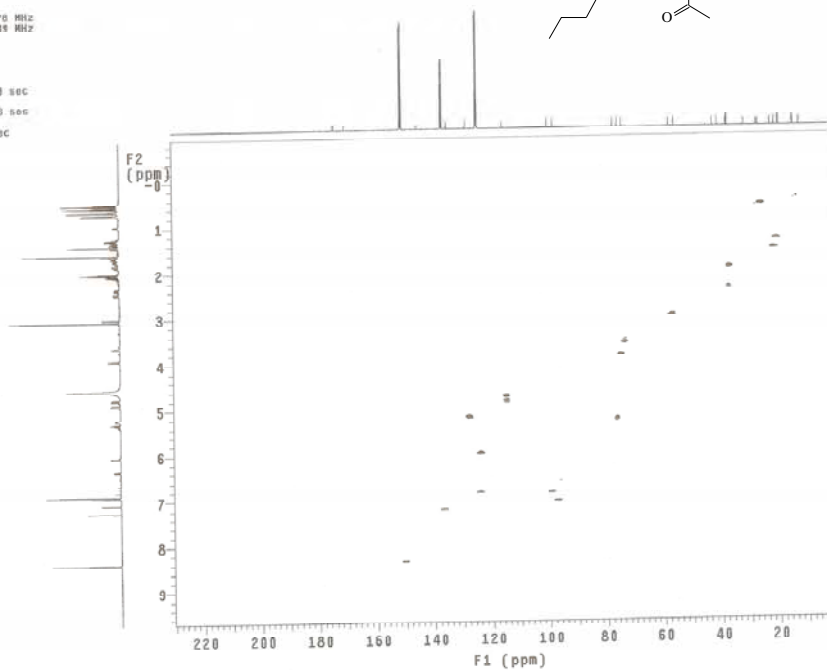
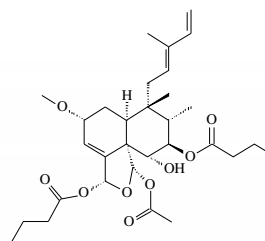


Anexo 7. Espectro de DEPT 90° da casearina J em piridina-d5 obtido em 125 MHz.

Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMOC
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-18-87
INOVA-500 "multis5"

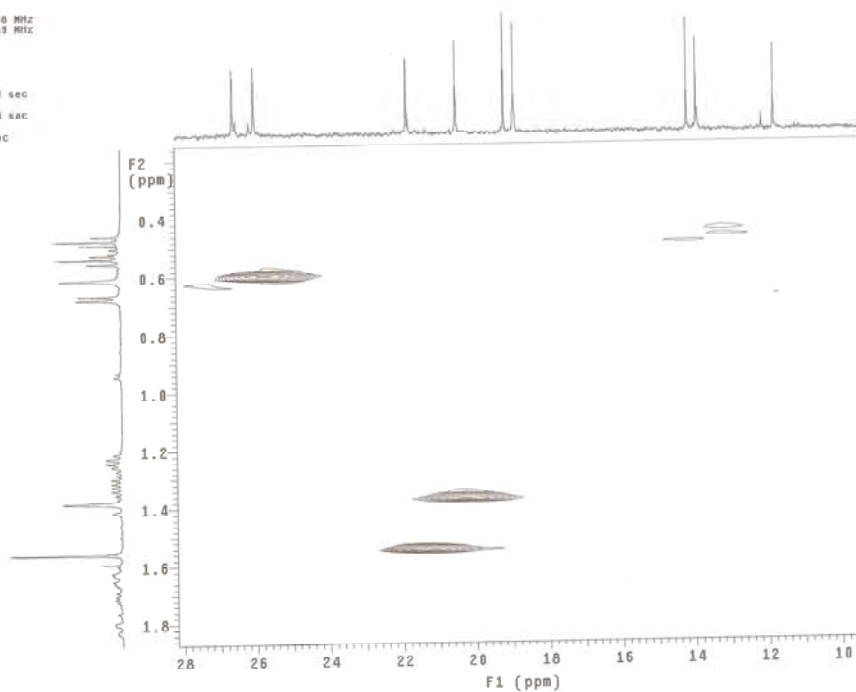
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.183 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 28897.6 Hz
8 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3266376 MHz
DECOUPLE C13, 125.587646 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.005 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.005 sec
F2 size 2048 x 2048
Total time 43 min, 12 sec



Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMOC
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-18-87
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.183 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 28897.6 Hz
8 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3266376 MHz
DECOUPLE C13, 125.587646 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.005 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.005 sec
F2 size 2048 x 2048
Total time 43 min, 12 sec



Anexo 8. Mapa de contorno gHMOC e expansão da casearina J (piridina-d₅, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA9 amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMQC

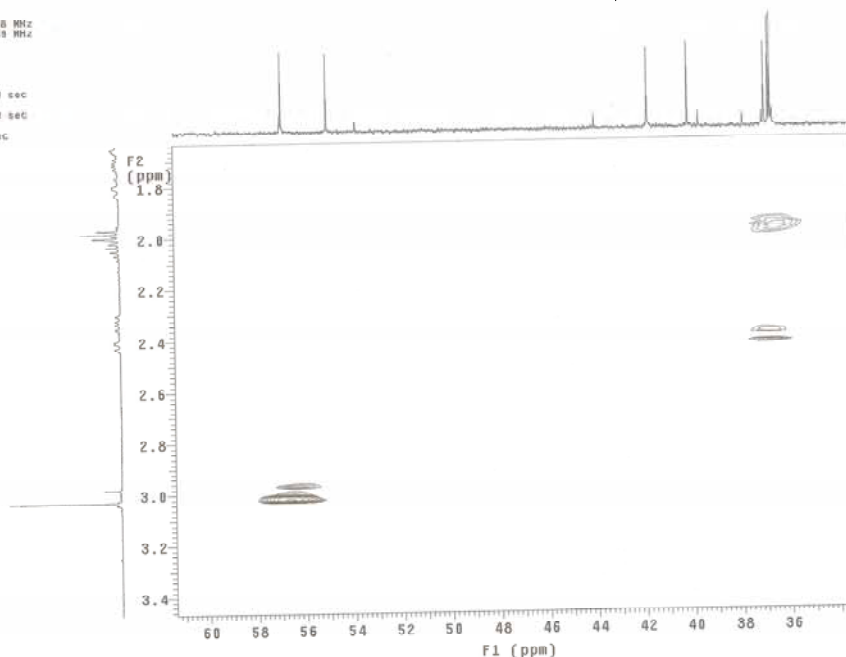
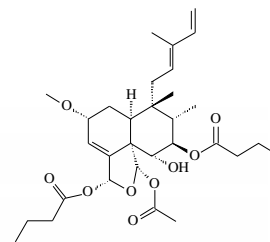
Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-87

INOVA-500 "multis15"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5299.4 Hz
2D Width 25027.6 Hz
0 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3866378 MHz
DECOUPLE C13, 125.5676949 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
QARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 6.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 43 min, 12 sec



Fernando Passarelli FA9 amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMQC

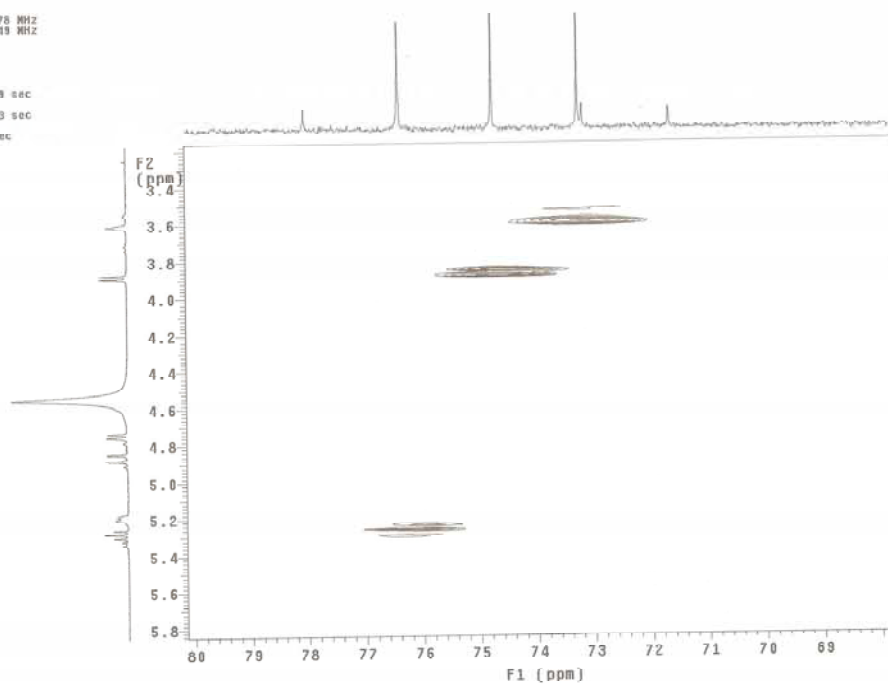
Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-87

INOVA-500 "multis15"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5299.4 Hz
2D Width 25027.6 Hz
0 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3866378 MHz
DECOUPLE C13, 125.5676949 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
QARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 6.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 43 min, 12 sec



Anexo 9. Expansão do mapa de contorno gHMQC da casearina J (piridina-d5, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA3 amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine

Temp: 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-07

INDY-300 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.193 sec

Width 5233.4 Hz

SD Width 28027.6 Hz

18 repetitions

128 increments

OBSERVE H1, 499.396578 MHz

DATA PROCESSING

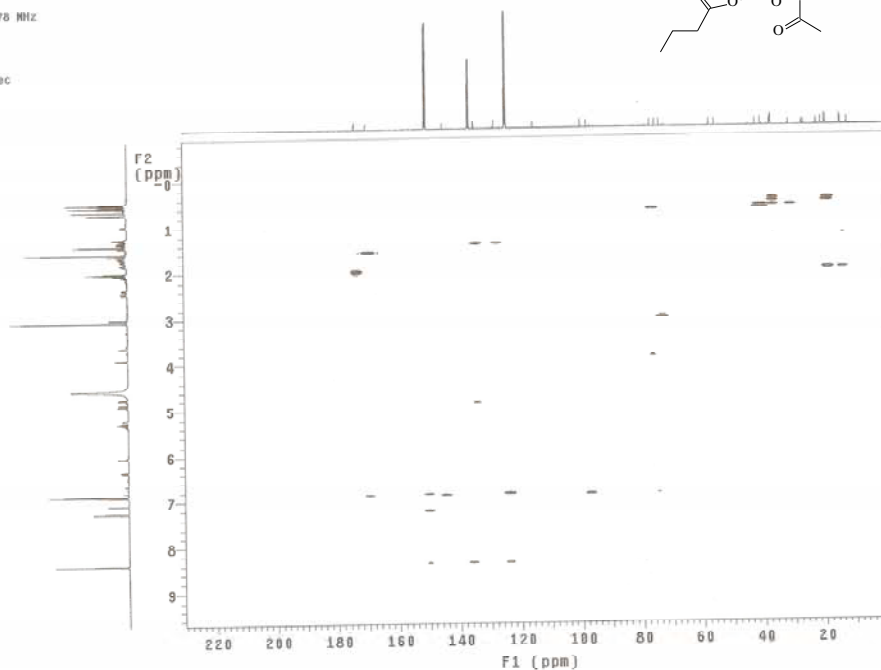
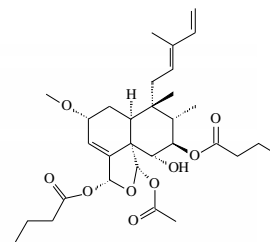
Sine bell 0.097 sec

F1 DATA PROCESSING

Sine bell 0.093 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 44 min, 16 sec



Anexo 10. Mapa de contorno gHMBC da casearina J (piridina-d₅, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA9 amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMBC

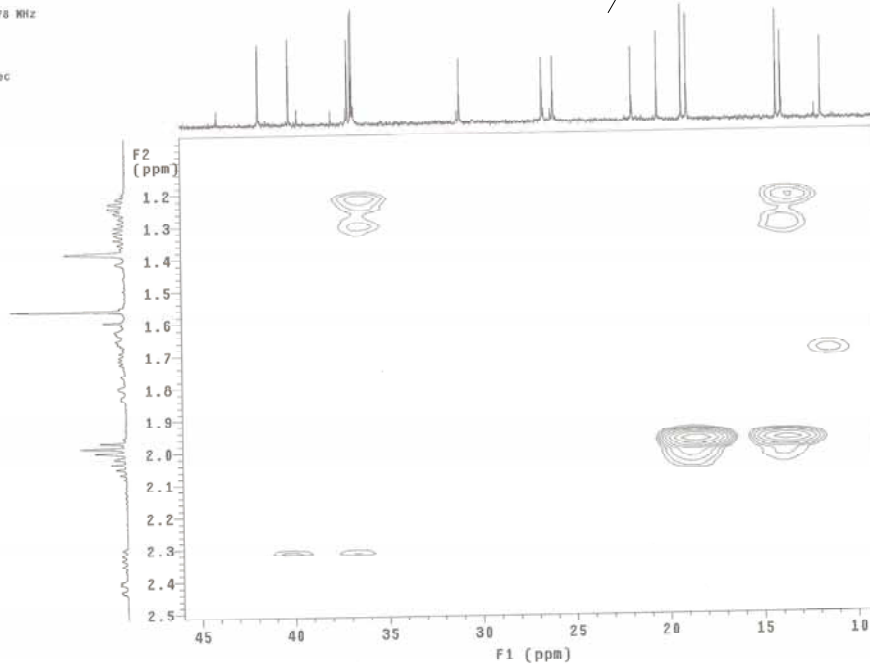
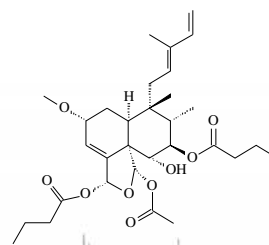
Solvent: pyridine

Temp: 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-07

INNOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 29027.6 Hz
16 repetitions
128 increments
OBSERVE H1: 499.3966378 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.097 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.093 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 44 min, 16 sec



Fernando Passarelli FA9 amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMBC

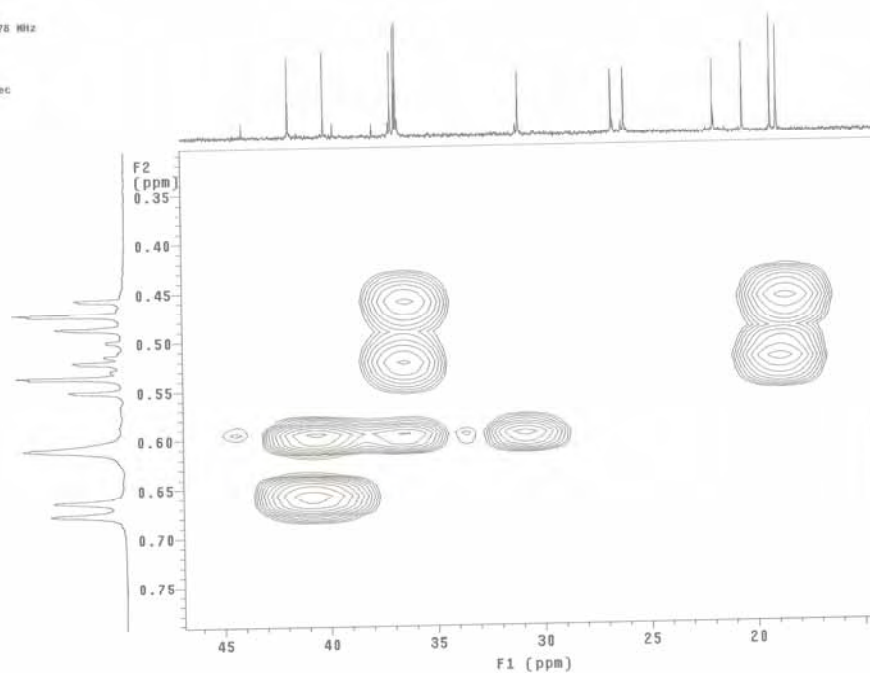
Solvent: pyridine

Temp: 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-07

INNOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 29027.6 Hz
16 repetitions
128 increments
OBSERVE H1: 499.3966378 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.097 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.093 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 44 min, 16 sec



Anexo 11. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina J (piridina-d₅, 11,7 T).

Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/08/09

Pulse Sequence: gHMBC

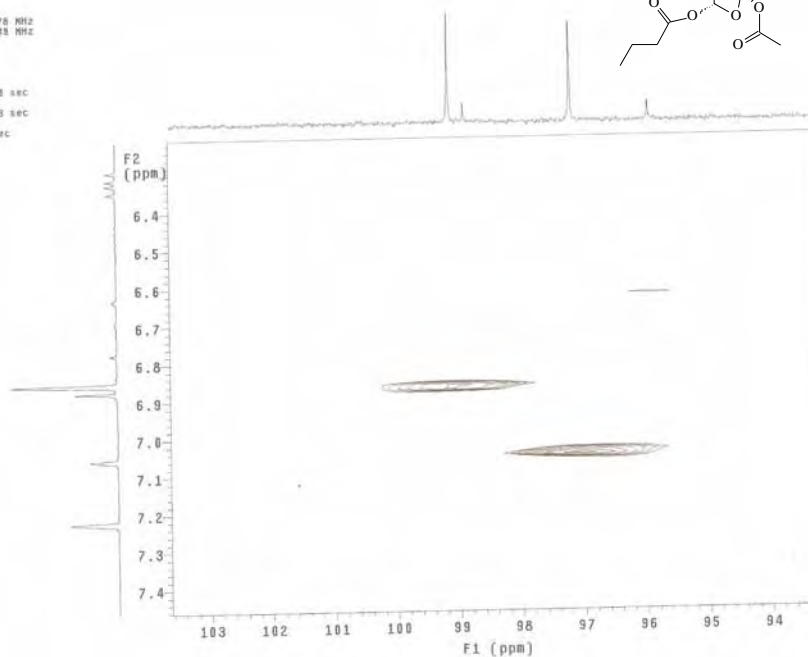
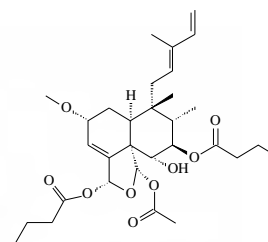
Solvent: pyridine

Temp: 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-87

INOVA-500 "multi65"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 28027.0 Hz
8 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 400.3866378 MHz
DECOUPLE C13, 125.5076948 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.089 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.093 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 43 min, 12 sec



Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/08/09

Pulse Sequence: gHMBC

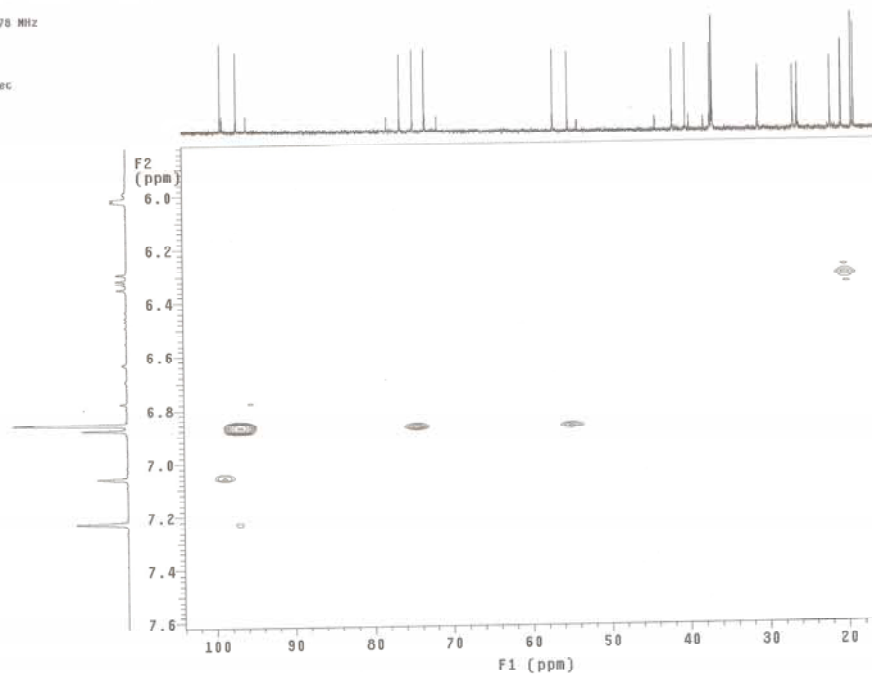
Solvent: pyridine

Temp: 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-87

INOVA-500 "multi65"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 28027.0 Hz
16 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 400.3866378 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.097 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.082 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 44 min, 16 sec



Anexo 12. Expansões de gHMBC da casearina J (piridina-d5, 11,7 T).

Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-87

INOVA-500 "multis"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.193 sec

Width 5299.4 Hz

2D Width 23027.6 Hz

16 repetitions

128 increments

OBSERVE H1, 499.366378 MHz

DATA PROCESSING

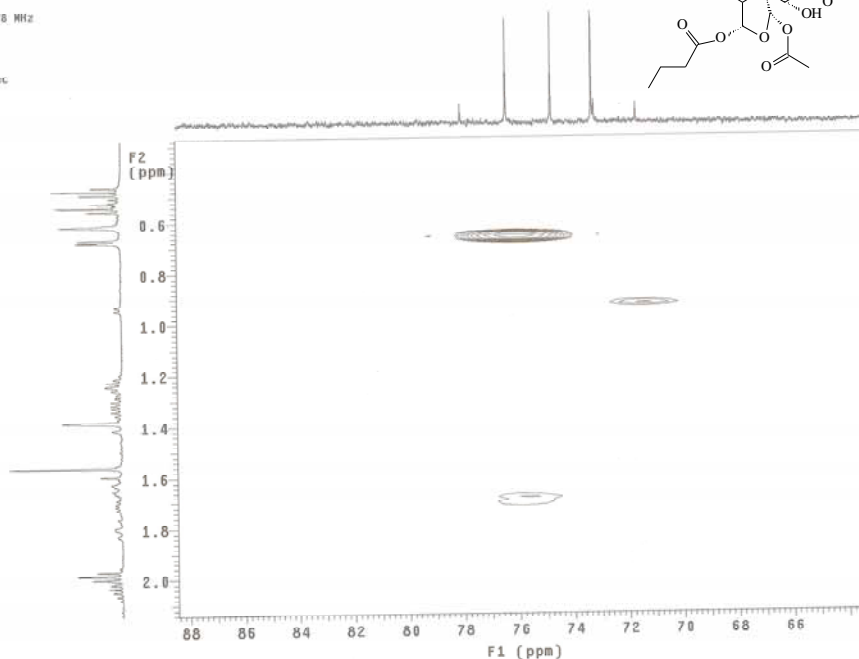
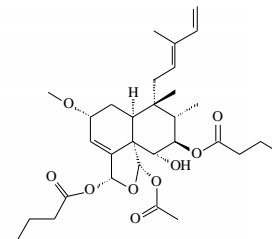
Sine bell 0.097 sec

F1 DATA PROCESSING

Sine bell 0.003 sec

FT size 2048 X 2048

Total time 44 min, 16 sec



Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-87

INOVA-500 "multis"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.193 sec

Width 5299.4 Hz

2D Width 23027.6 Hz

16 repetitions

128 increments

OBSERVE H1, 499.366378 MHz

DATA PROCESSING

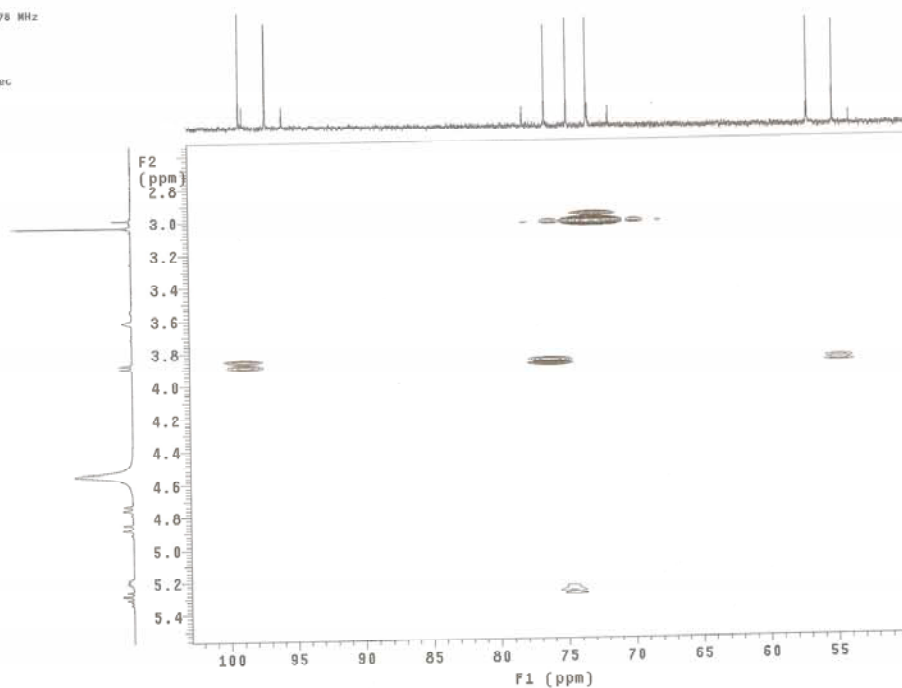
Sine bell 0.097 sec

F1 DATA PROCESSING

Sine bell 0.003 sec

FT size 2048 X 2048

Total time 44 min, 16 sec



Anexo 13. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina J (piridina-d₅, 11,7 T).

Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/09/09

Pulse Sequence: gHMBC

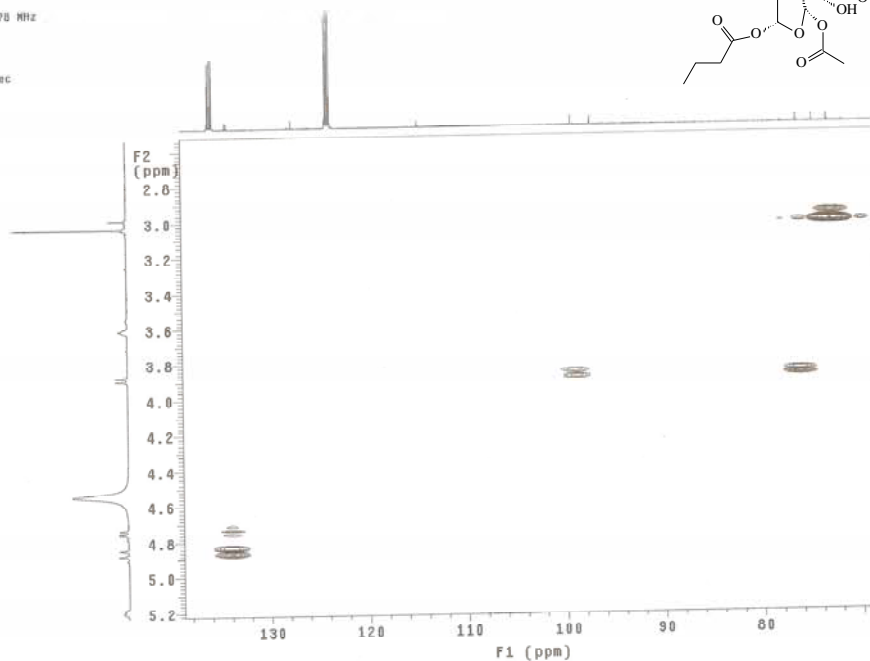
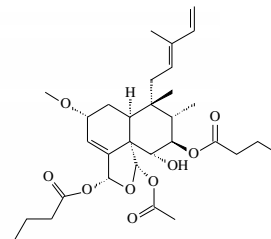
Solvent: pyridine

Temp: 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-07

INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 29027.6 Hz
16 repetitions
128 increments
OBSERVE H1: 499.3866378 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.097 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.093 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 44 min, 16 sec



Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/09/09

Pulse Sequence: gHMBC

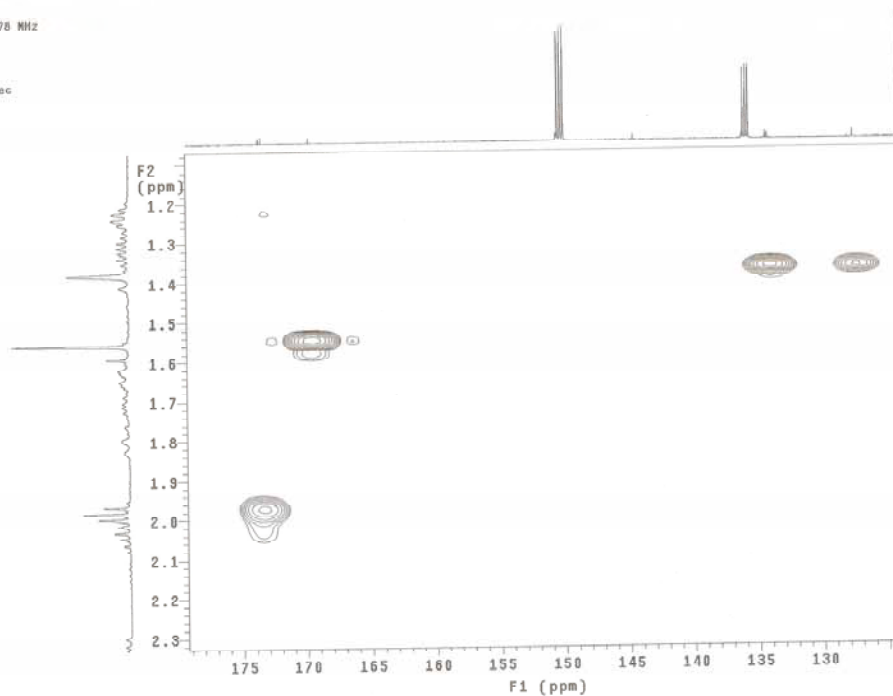
Solvent: pyridine

Temp: 30.0 C / 303.1 K

User: 1-14-07

INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 29027.6 Hz
16 repetitions
128 increments
OBSERVE H1: 499.3866378 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.097 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.093 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 44 min, 16 sec



Anexo 14. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina J (piridina-d₅, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA9 amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMBC

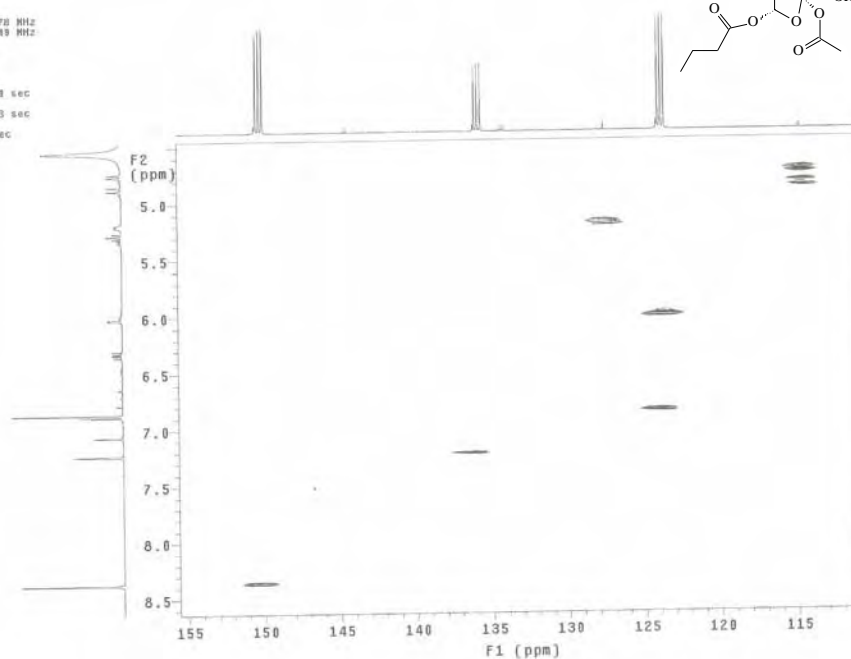
Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

User: i-14-07

INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 29027.6 Hz
8 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.5965378 MHz
DECOUPLE C13, 125.5076949 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.005 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 53 min, 12 sec



Fernando Passarelli FA9 amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gHMBC

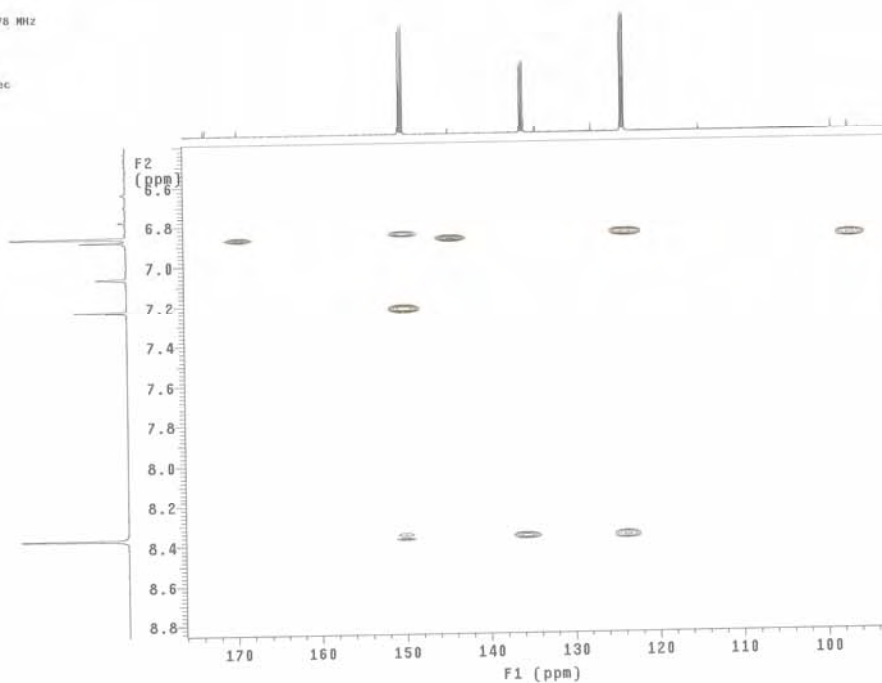
Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

User: i-14-07

INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.193 sec
Width 5289.4 Hz
2D Width 29027.6 Hz
16 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.5965378 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.097 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.093 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 44 min, 19 sec



Anexo 15. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina J (piridina-d₅, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA9 amostra 10 Pico 10 24/06/99

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

INOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.133 sec

Width 5299.4 Hz

SD Width 5299.4 Hz

8 repetitions

128 increments

OBSERVE H1 499.366376 MHz

DATA PROCESSING

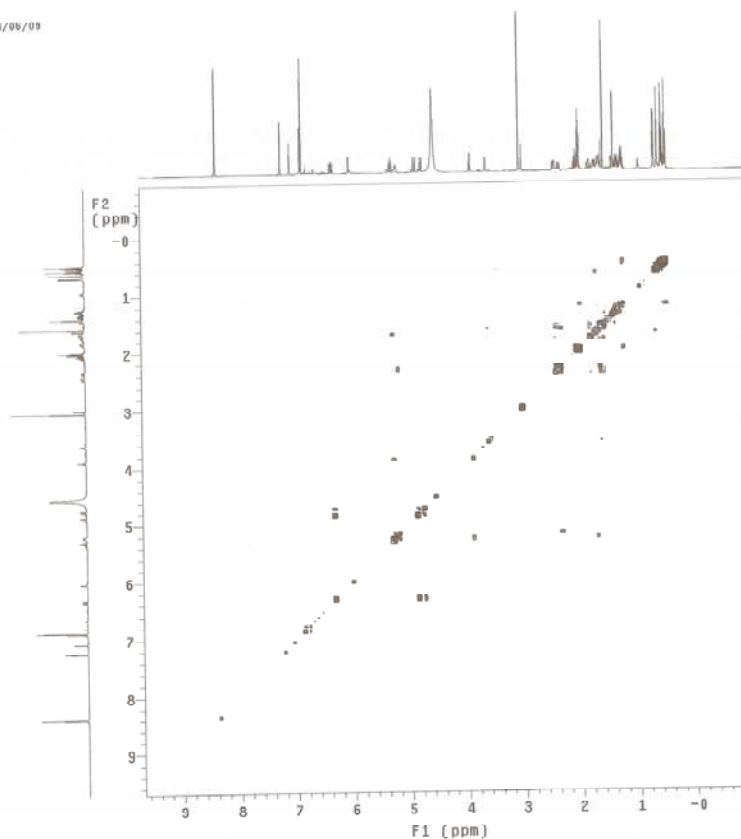
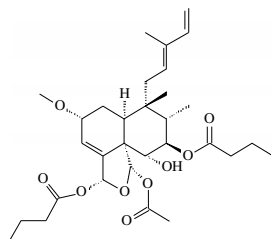
Sq. sine bell 0.097 sec

F1 DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.010 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 21 min, 6 sec



Fernando Passarelli FA9 amostra 10 Pico 10 24/06/99

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

INOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.133 sec

Width 5299.4 Hz

SD Width 5299.4 Hz

8 repetitions

128 increments

OBSERVE H1 499.366376 MHz

DATA PROCESSING

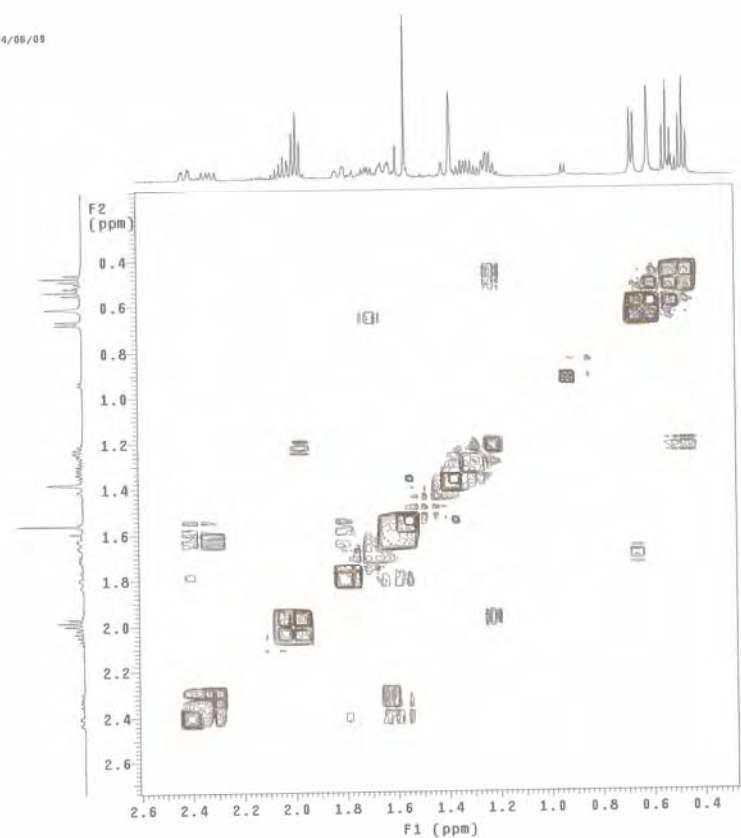
Sq. sine bell 0.097 sec

F1 DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.010 sec

FT size 2048 x 2048

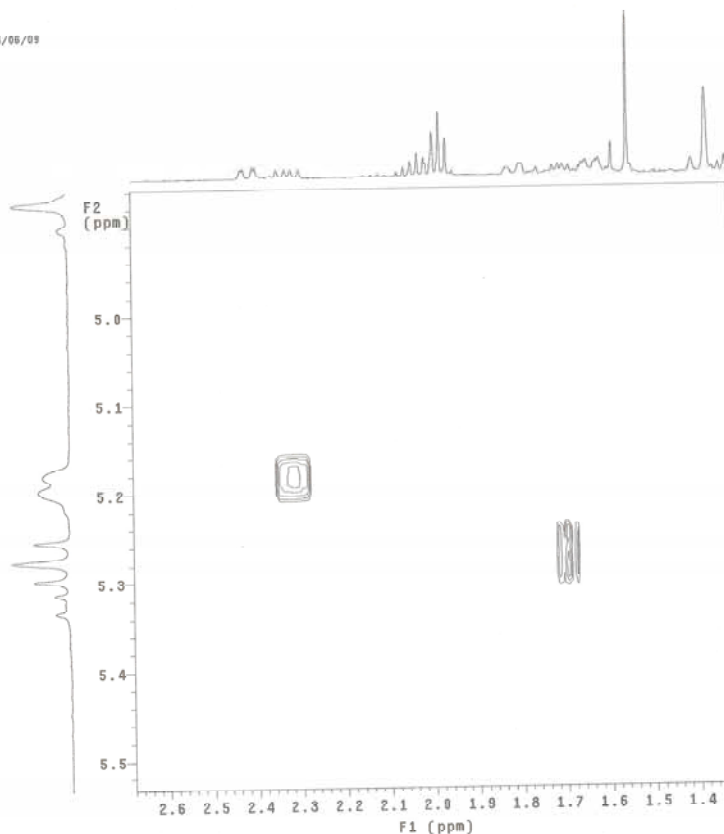
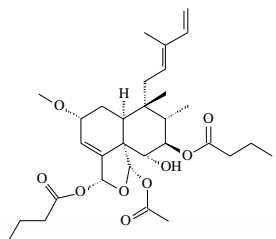
Total time 21 min, 6 sec



Anexo 16. Mapa de contorno gCOSY e expansão da casearina J (piridina-d₅, 11,7 T).

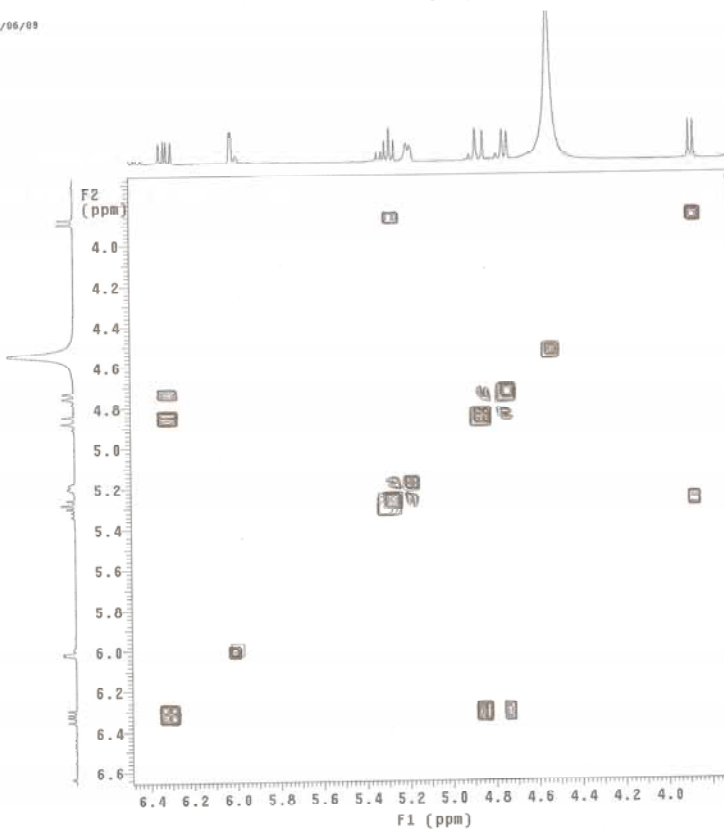
Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/06/09

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis5"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.153 sec
Width 5299.4 Hz
2D Width 5299.4 Hz
3 repetitions
120 increments
OBSERVE H1 498.3966370 MHz
DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.097 sec
F1 DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.013 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 21 min, 6 sec

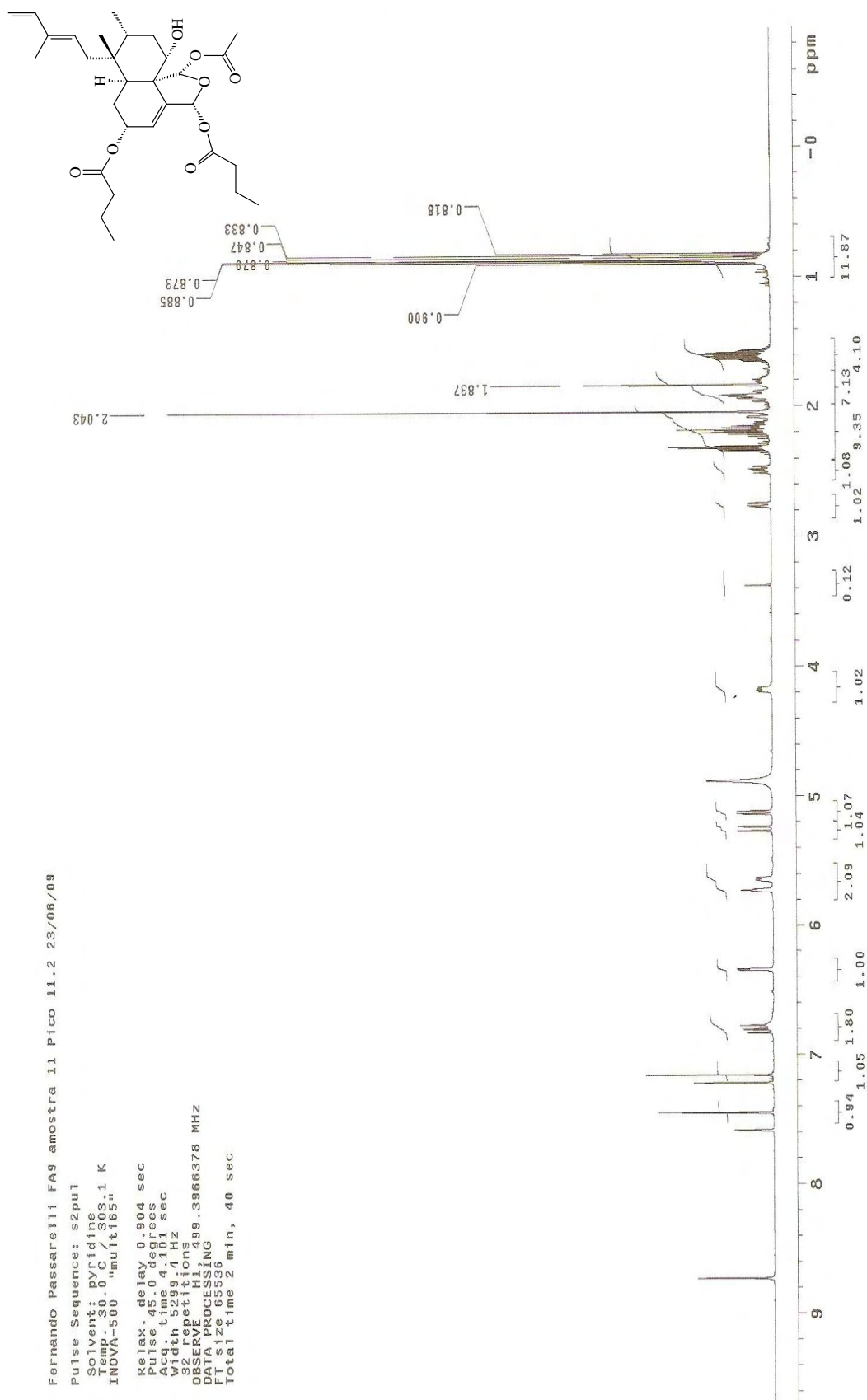


Fernando Passarelli FAS amostra 10 Pico 10 24/06/09

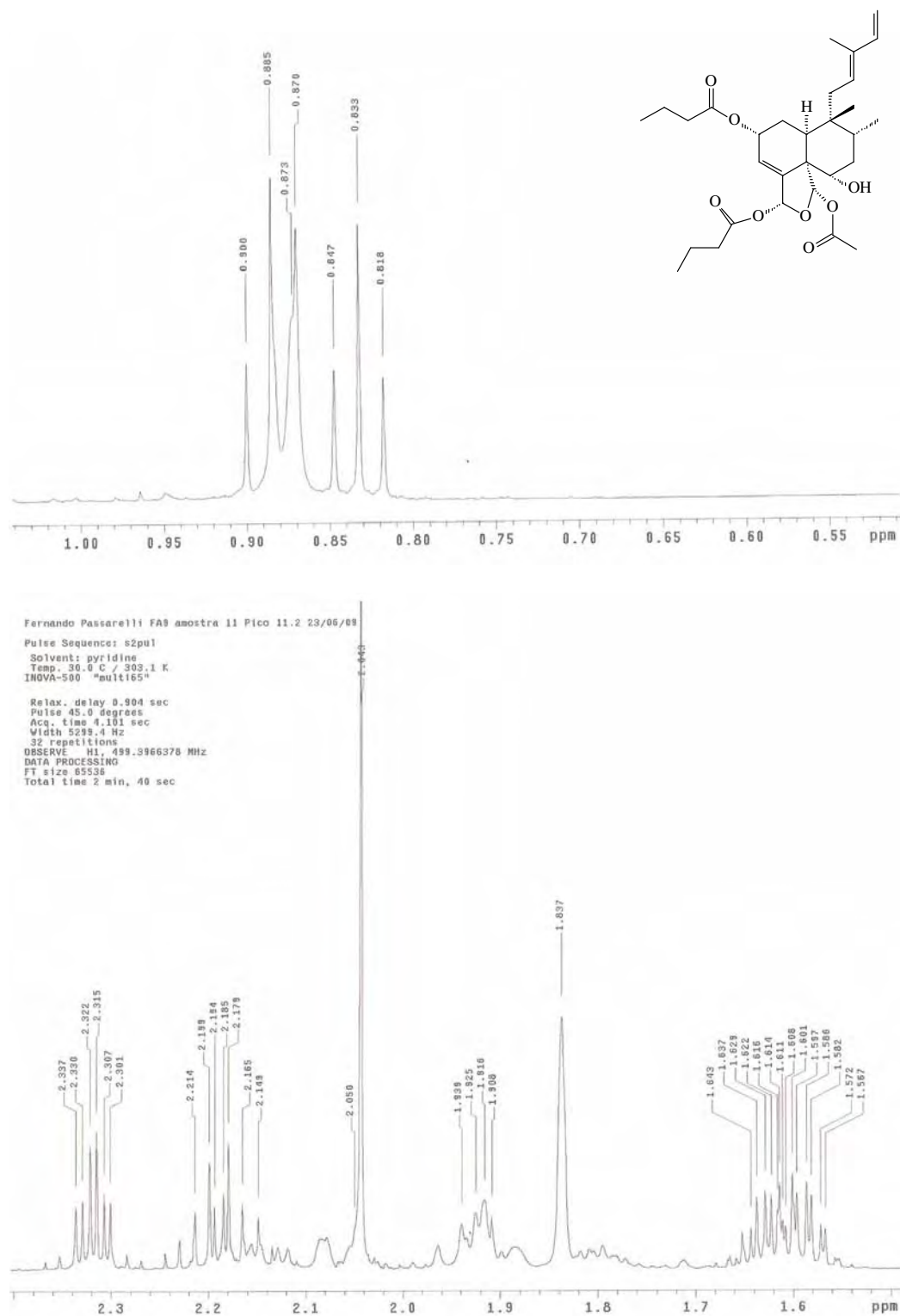
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis5"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.153 sec
Width 5299.4 Hz
2D Width 5299.4 Hz
3 repetitions
120 increments
OBSERVE H1 498.3966370 MHz
DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.097 sec
F1 DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.013 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 21 min, 6 sec



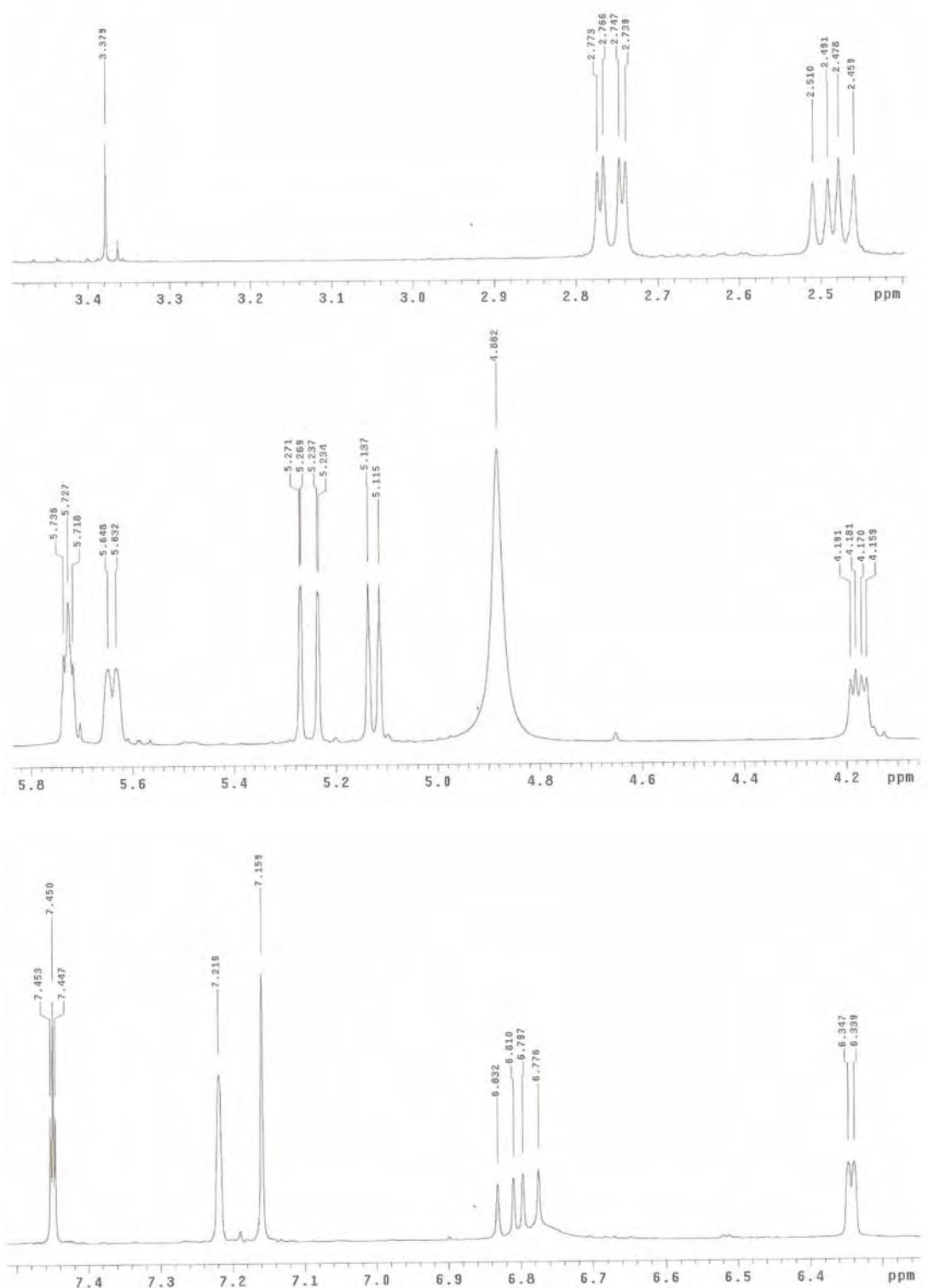
Anexo 17. Expansões do mapa de contorno gCOSY da casearina J (piridina-d₅, 11,7 T).



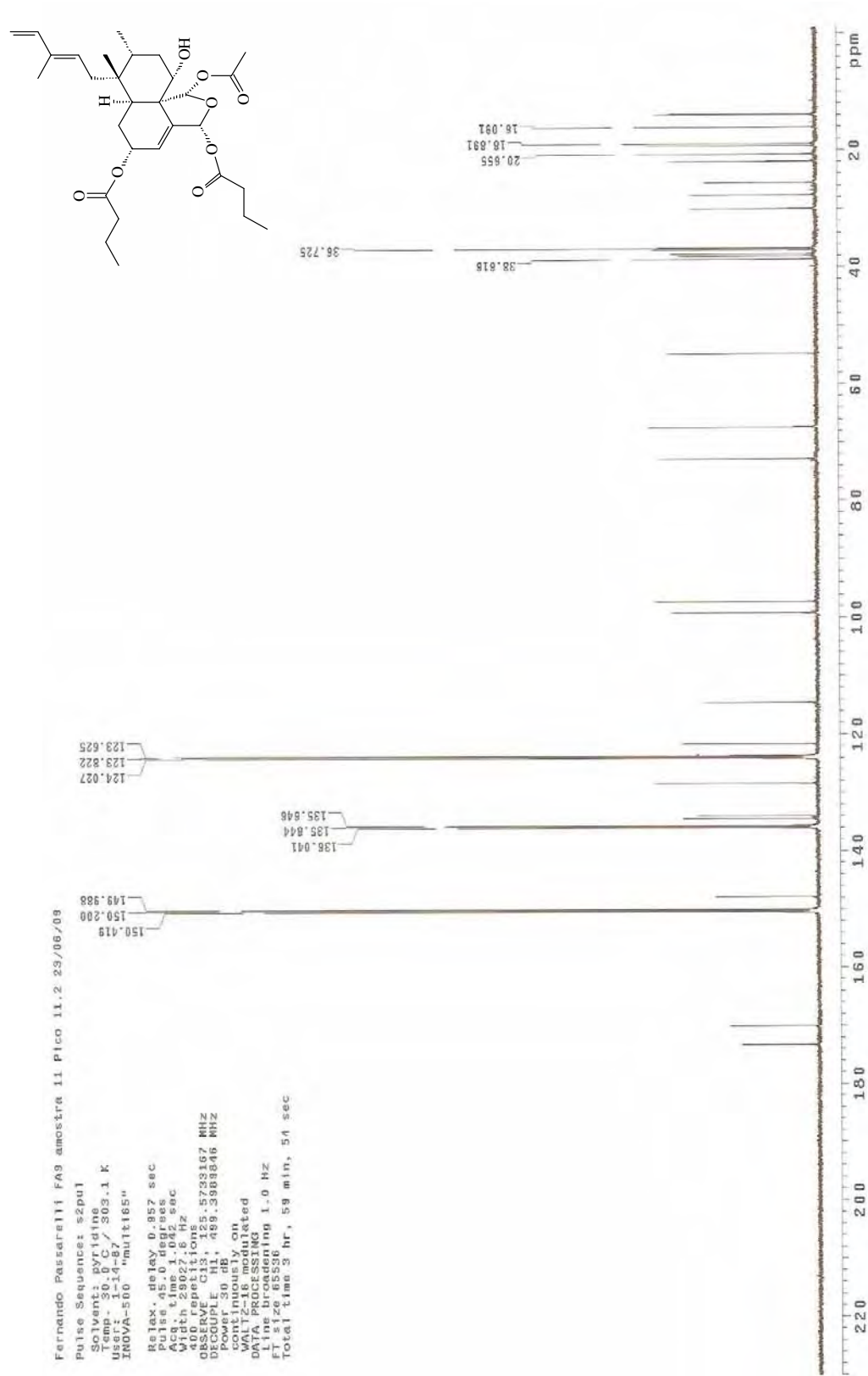
Anexo 18. Espectro de RMN de ^1H da casearina X em piridina- d_5 obtido em 500 MHz.



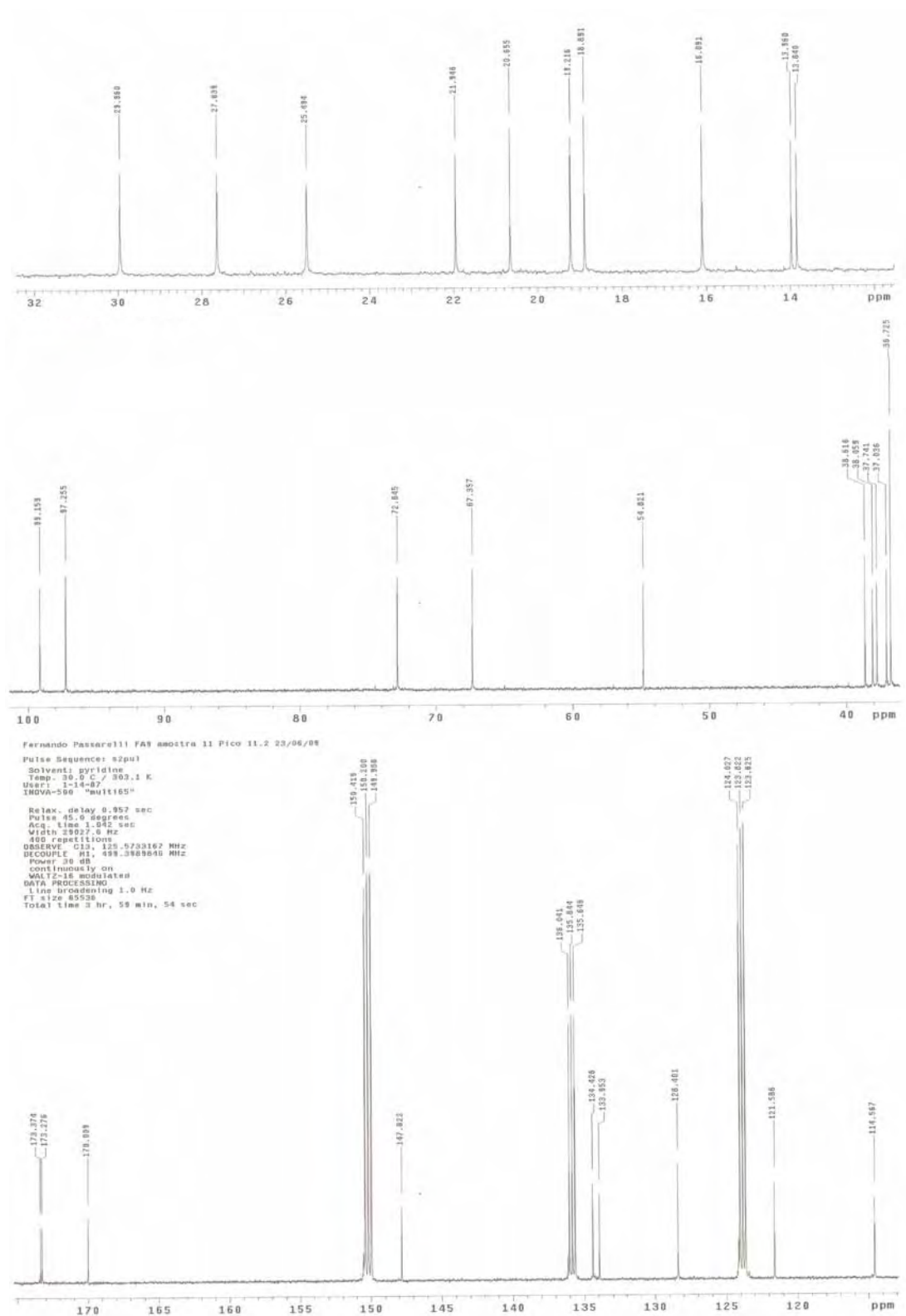
Anexo 19. Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina X em piridina- d_5 obtido em 500 MHz.



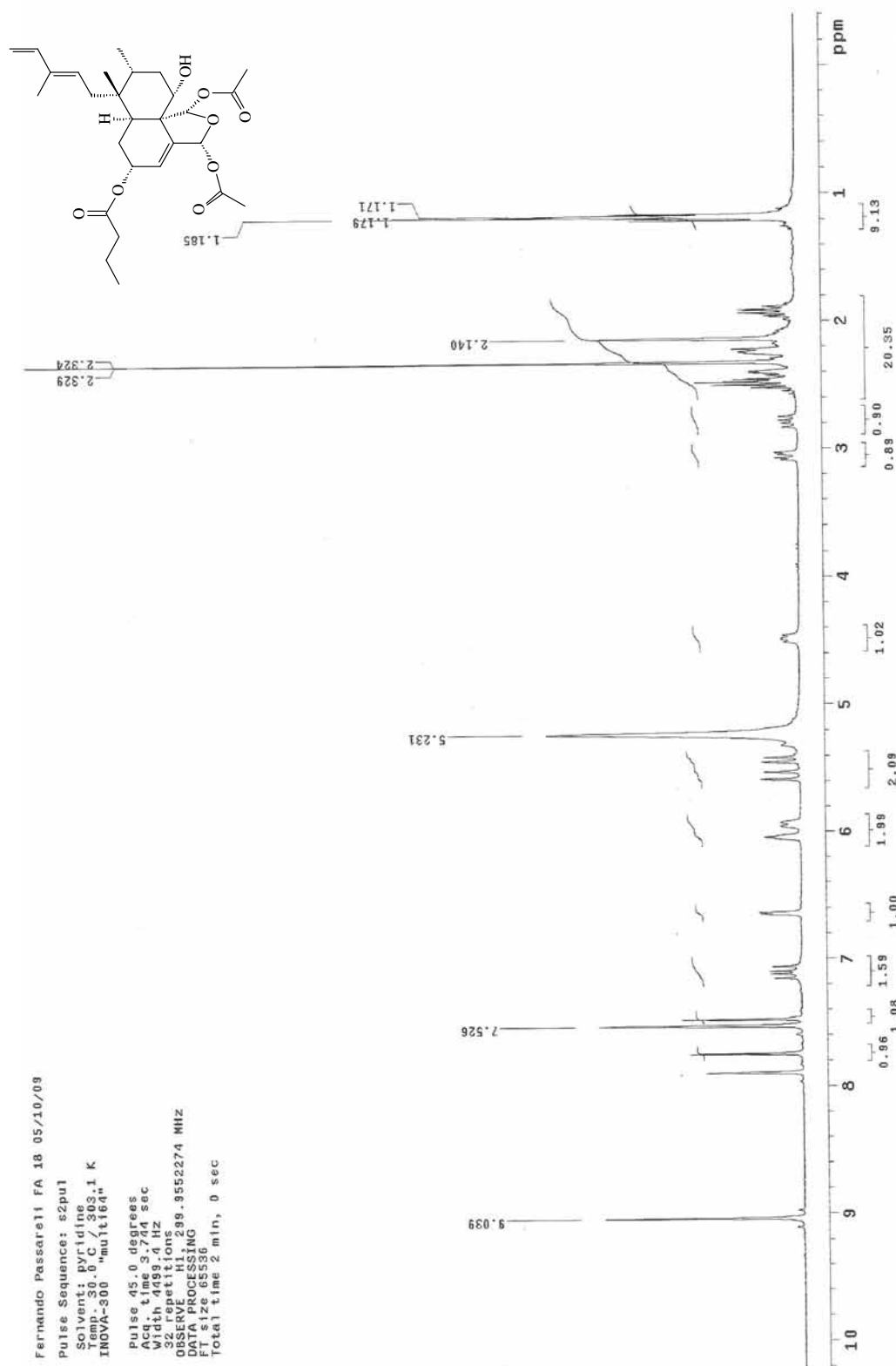
Anexo 20. Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina X em piridina- d_5 obtido em 500 MHz.



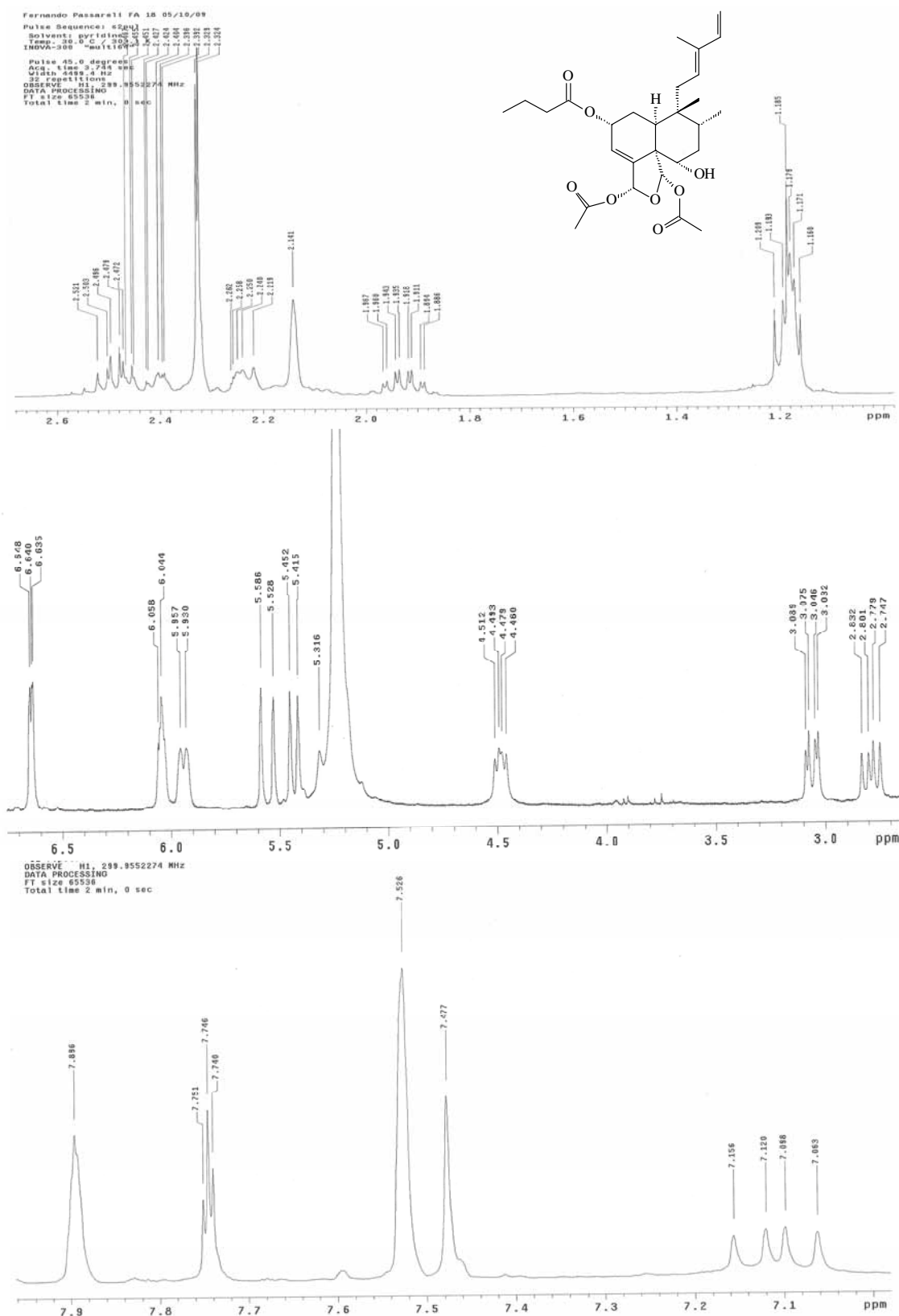
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{13}C da casearina X em piridina-d5 obtido em 125 MHz.



Anexo 22. Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da casearina X em piridina- d_5 obtido em 125 MHz.

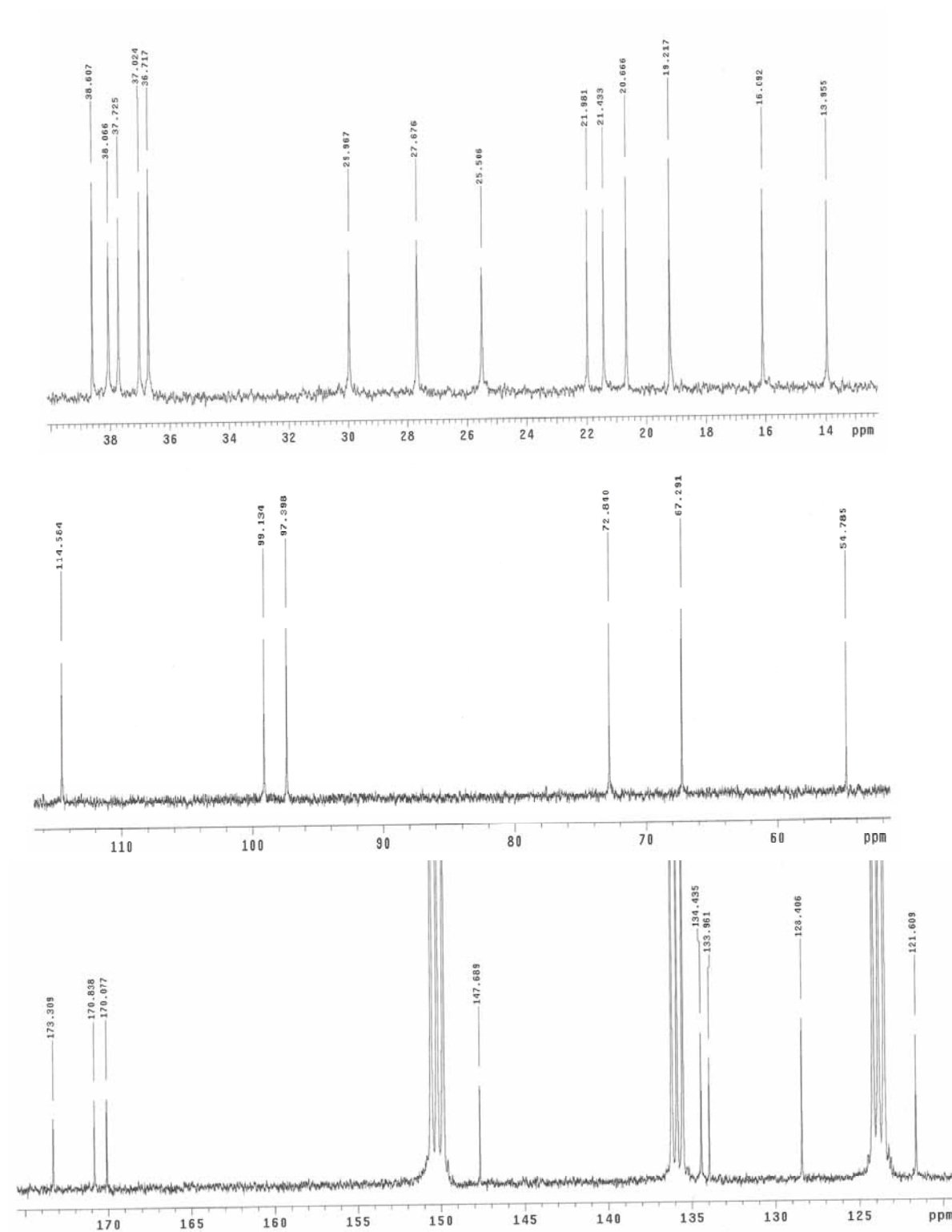


Anexo 23. Espectro de RMN de ^1H da caseargwiina F em piridina- d_5 obtido em 300 MHz.

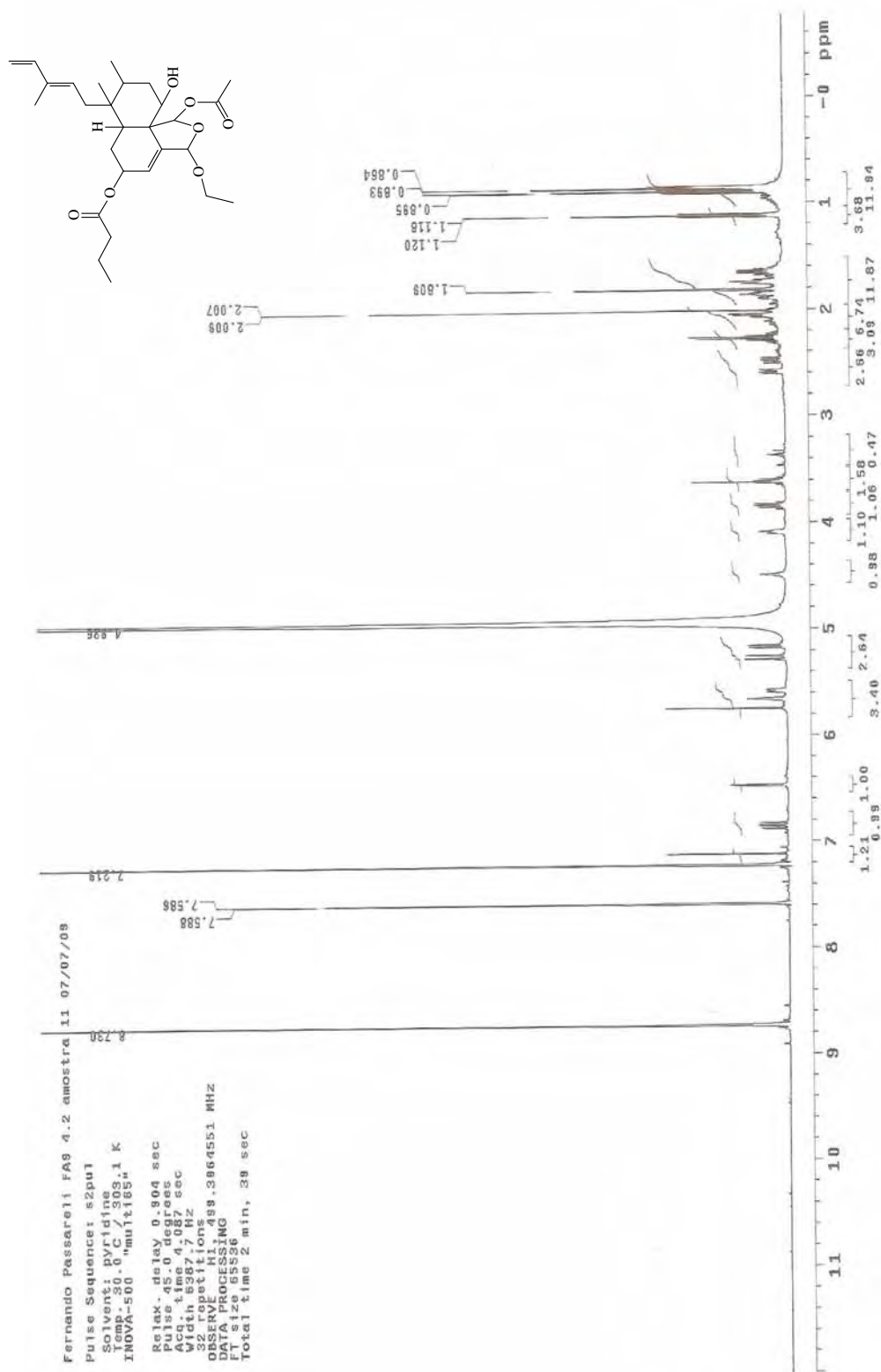


Anexo 24. Expansões do espectro de RMN de ^1H da caseargreina F em piridina- d_5 obtido em 300 MHz.

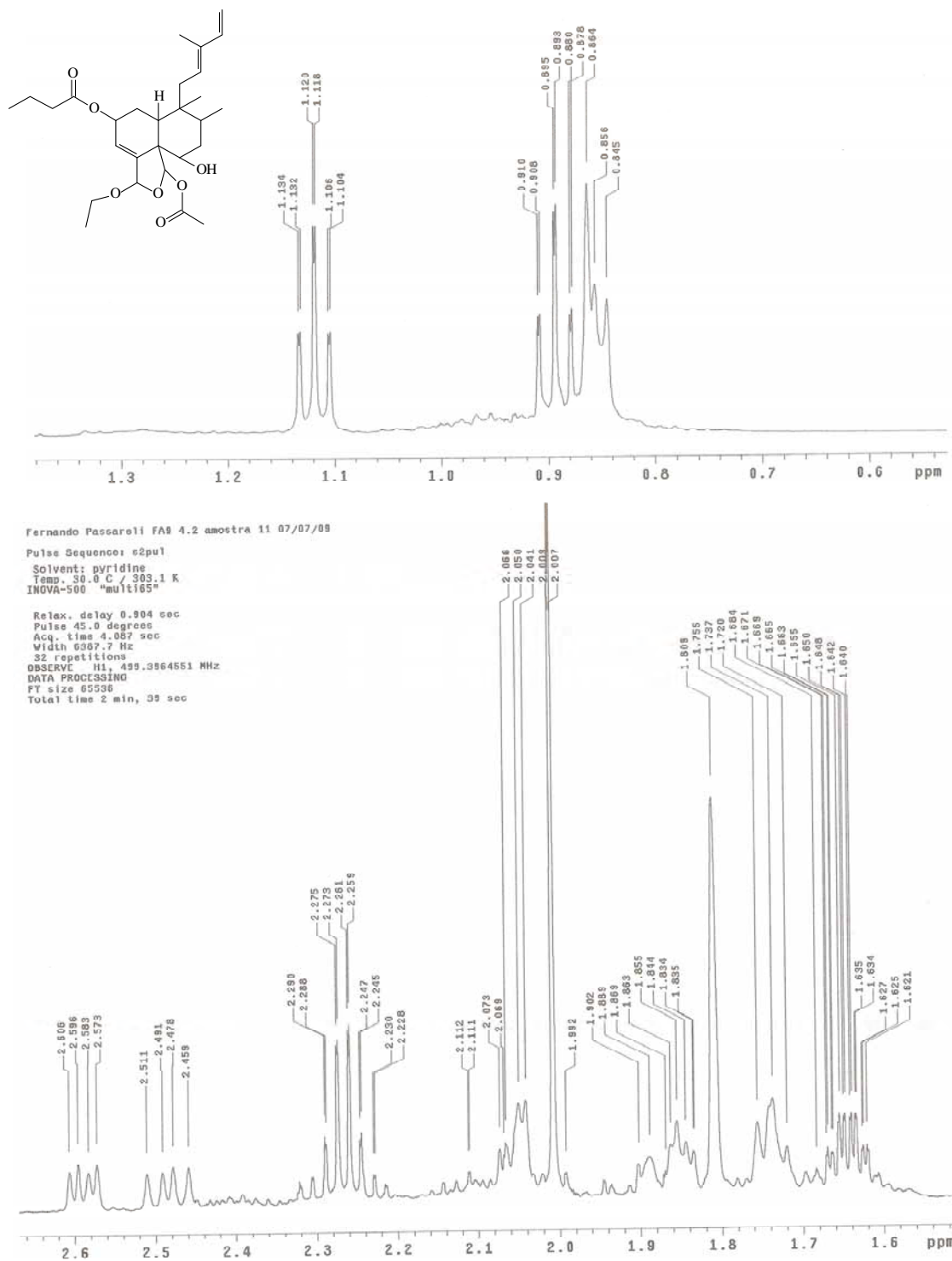
Anexo 25. Espectro de RMN de ^{13}C da caseargrewiina F em piridina- d_5 obtido em 75 MHz.



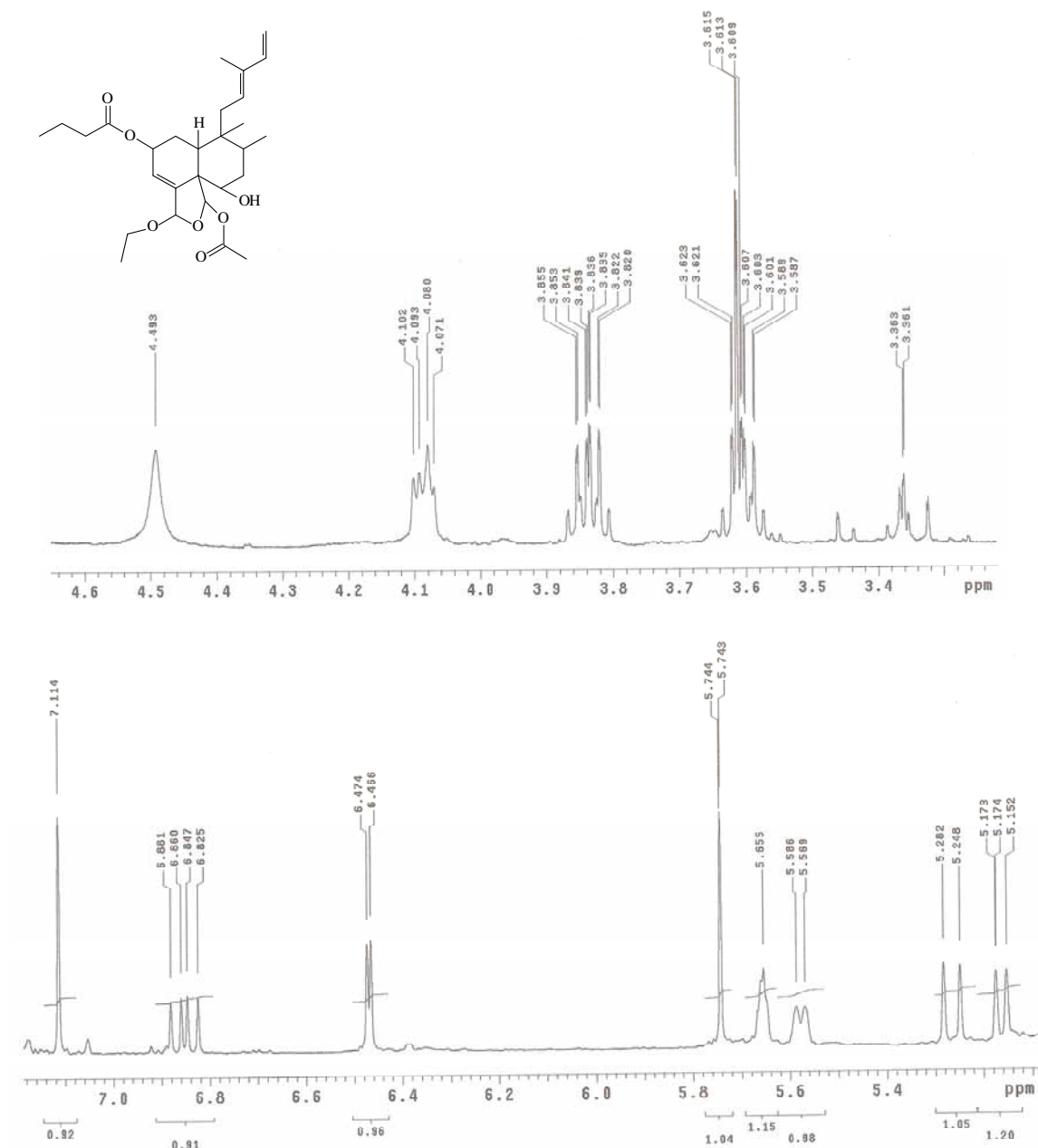
Anexo 26. Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da caseargreina F em piridina- d_5 obtido em 75 MHz.



Anexo 27. Espectro de RMN de ^1H da casearina Z em piridina- d_5 obtido em 500 MHz.

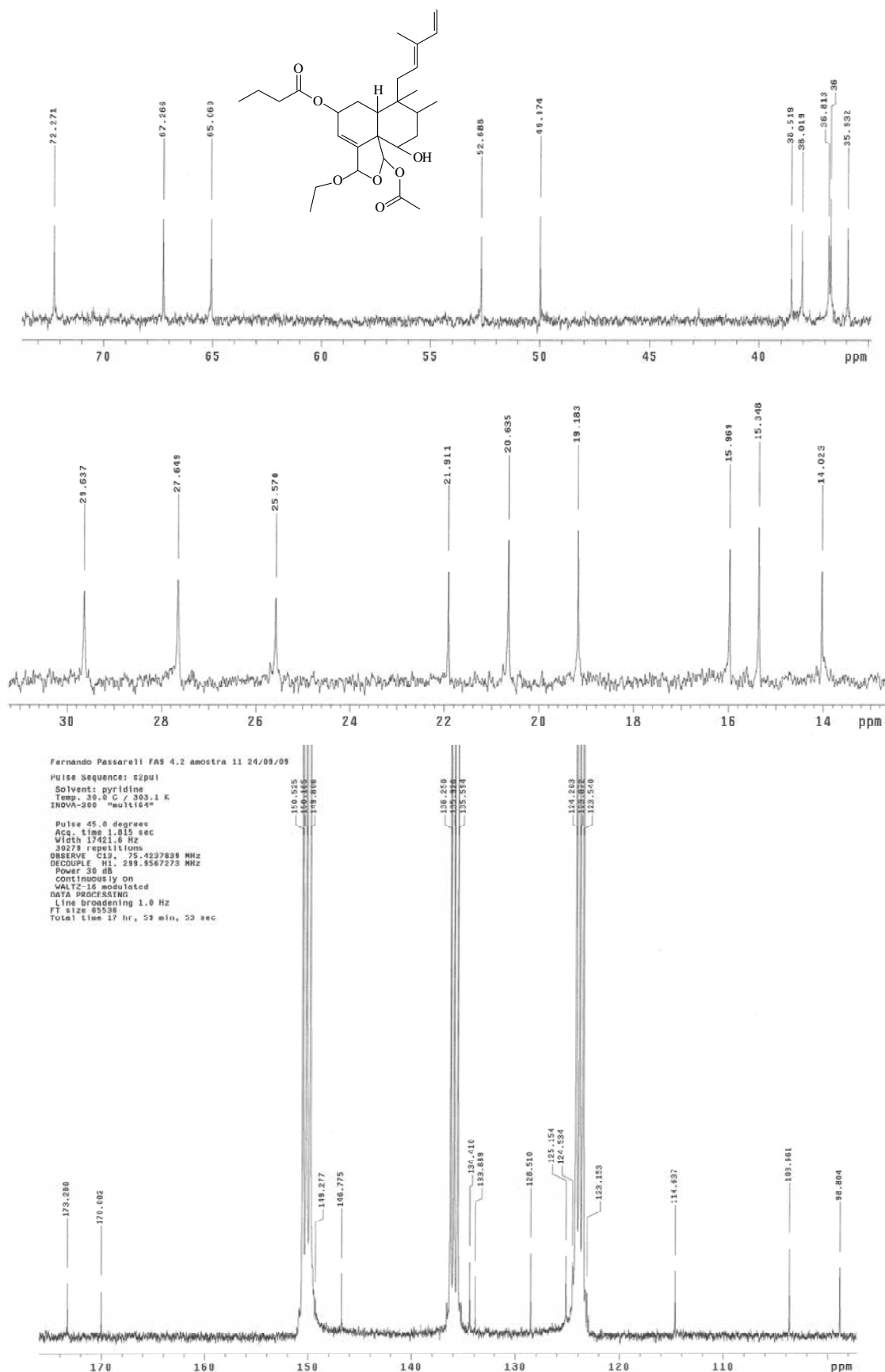


Anexo 28. Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina Z em piridina- d_5 obtido em 500 MHz.

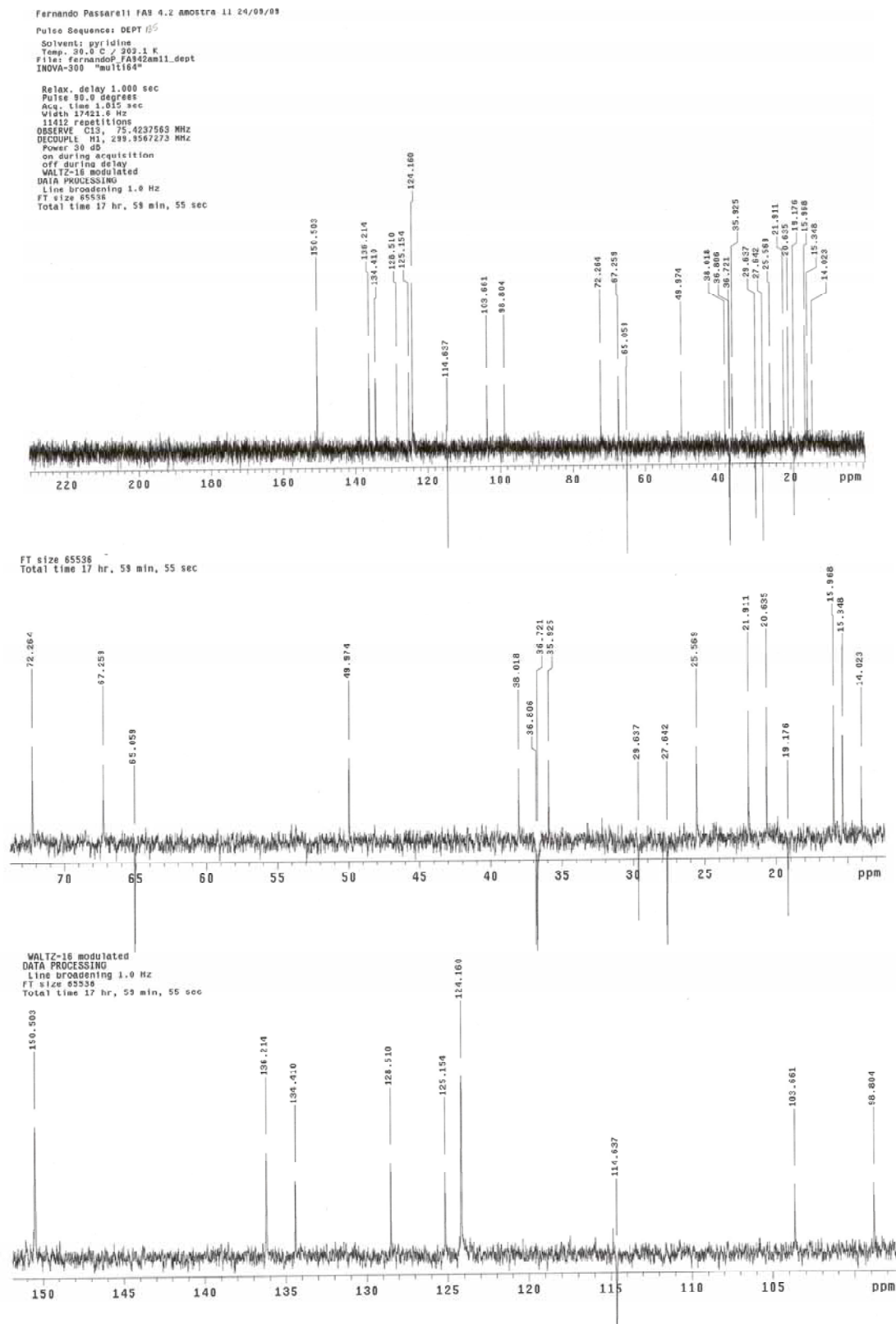


Anexo 29. Expansões do espectro de RMN de ^1H da casearina Z em piridina- d_5 obtido em 500 MHz.

Anexo 30. Espectro de RMN de ^{13}C da casearina Z em piridina- d_5 obtido em 75 MHz.

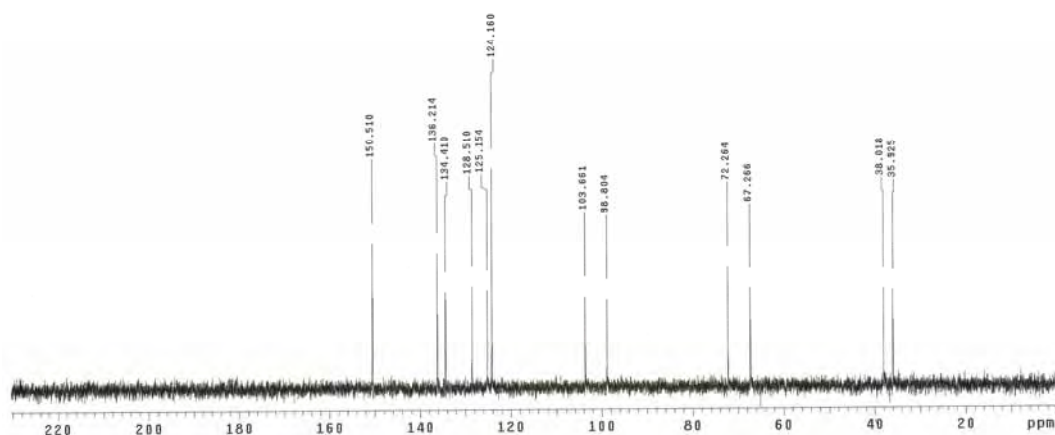


Anexo 31. Expansões do espectro de RMN de ^{13}C da casearina Z em piridina-d₅ obtido em 75 MHz.



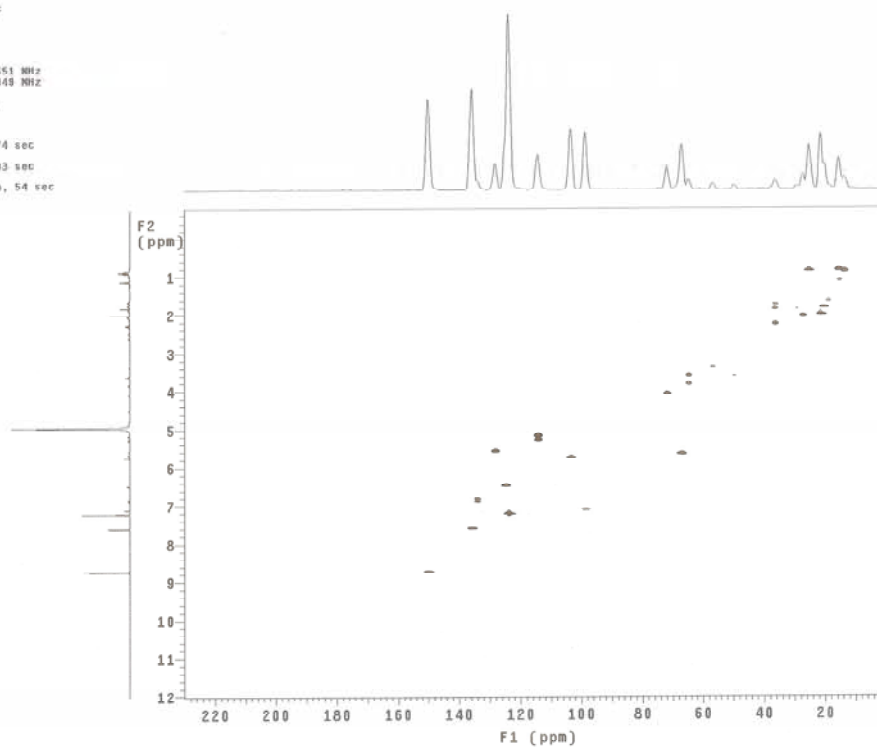
Anexo 32. Espectro de DEPT 135° (incluindo expansões abaixo) da casearina Z em piridina- d_5 obtido em 75 MHz.

Fernando Passarelli FAB 4.2 amostra 11 24/09/09
Pulse Sequence: DEPT 90
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
File: fernando_FAB42am11_dept
INOVA-300 "mult164"
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.815 sec
Width 17421.6 Hz
11412 repetitions
OBSERVE C13, 75.4297563 MHz
DECOUPLE H1, 299.8567273 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 17 hr, 59 min, 55 sec



Anexo 33. Espectro de DEPT 90° da casearina Z em piridina-d5 obtido em 75 MHz.

Fernando Passarelli FAB 4.2 amostra 11 07/07/09
Pulse Sequence: gHMQC
Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "mult165"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 8387.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
80 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 498.9866551 MHz
DECOUPLE C13, 125.5678849 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.074 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.093 sec
FT size 2040 x 2040
Total time 6 hr, 54 min, 54 sec



Anexo 34. Mapa de contorno gHMQC da casearina Z (piridina-d5, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA9 4.2 amostra 11 07/07/99

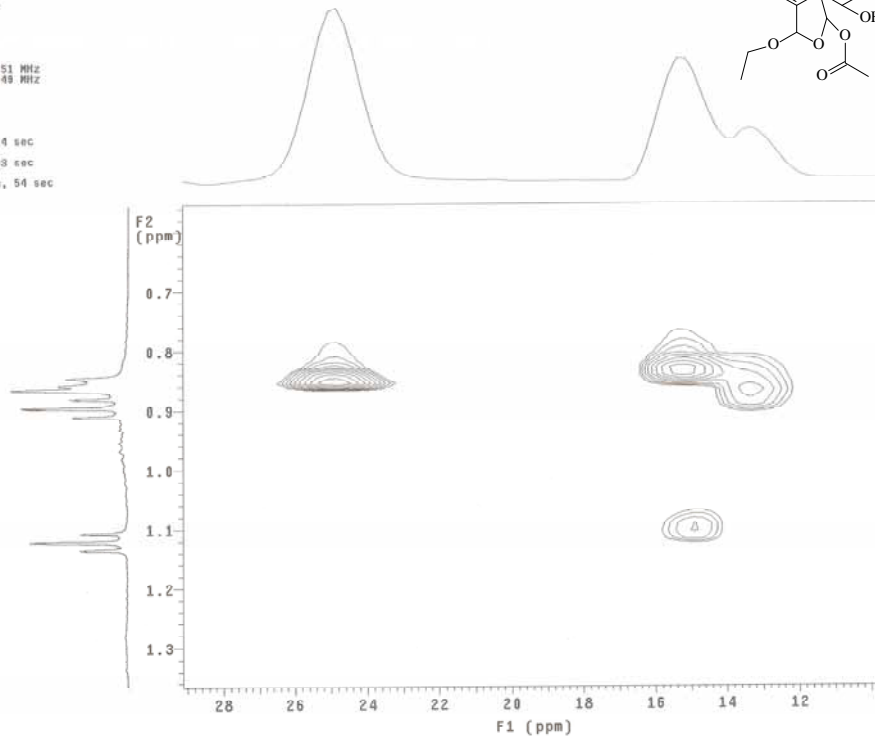
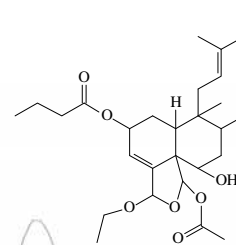
Pulse Sequence: gHMOC

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

INNOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.100 sec
Width 6307.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
80 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3864551 MHz
DECOUPLE C13, 125.5876949 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.074 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 6 hr, 54 min, 54 sec



Fernando Passarelli FA9 4.2 amostra 11 07/07/99

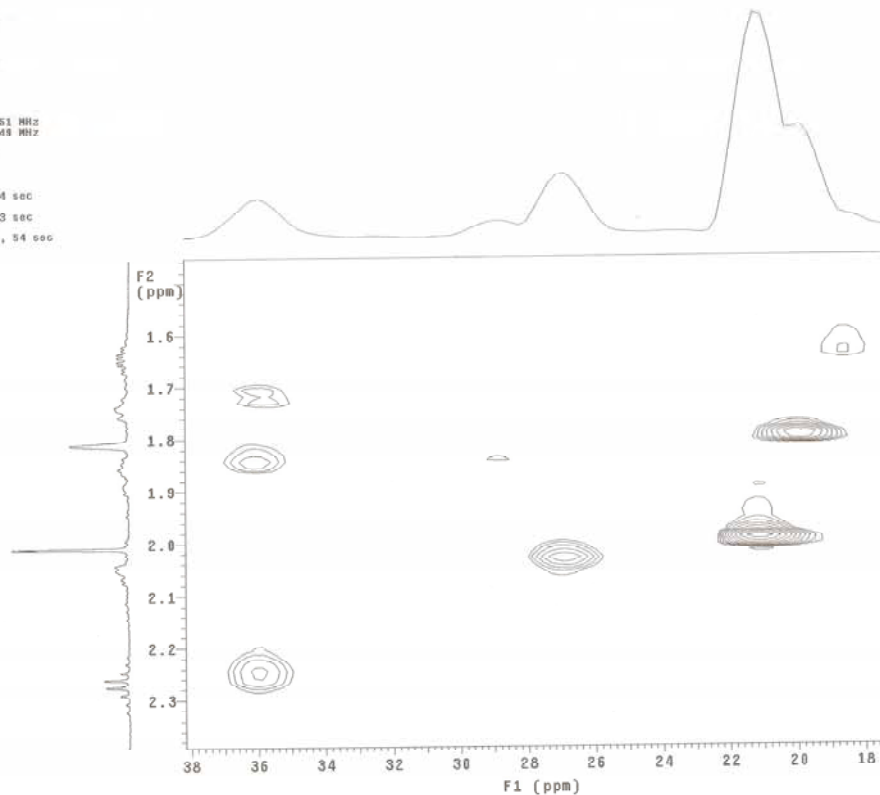
Pulse Sequence: gHMOC

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

INNOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.100 sec
Width 6307.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
80 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3864551 MHz
DECOUPLE C13, 125.5876949 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.074 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 6 hr, 54 min, 54 sec



Anexo 35. Expansões do mapa de contorno gHMOC da casearina Z (piridina-d5, 11,7 T).

Fernando Passarelli FAS 4.2 amostra 11 07/07/09

Pulse Sequence: gHMOC

Solvent: pyridine

Temp.: 30.0 C / 303.1 K

INNOVA-500 "multis"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.160 sec

Width 8387.7 Hz

2D Width 28027.6 Hz

90 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 499.3864551 MHz

DECOUPLE C13, 125.5678948 MHz

Power 47 dB

on during acquisition

off during delay

GARP-1 modulated

DATA PROCESSING

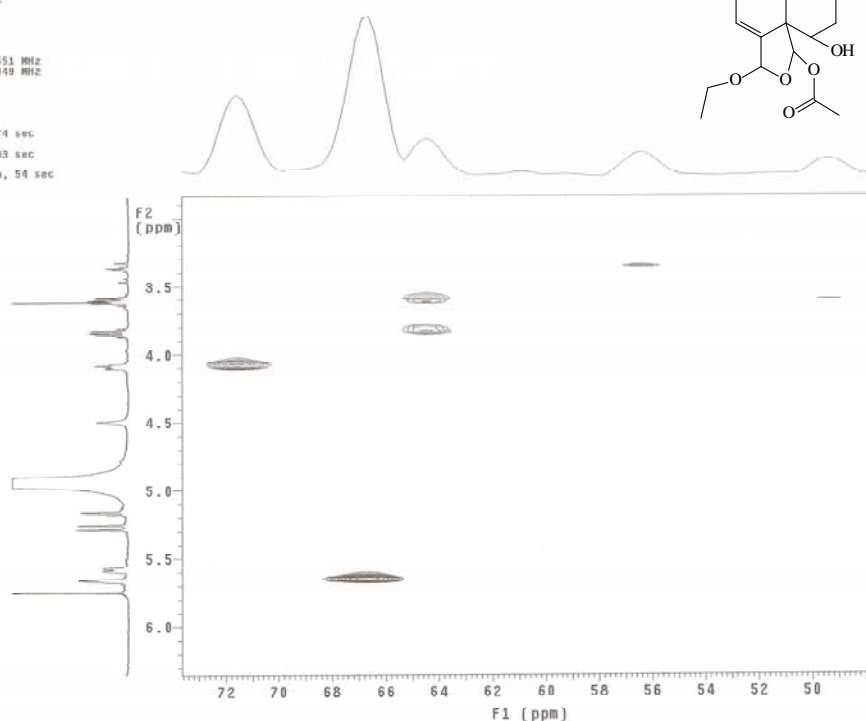
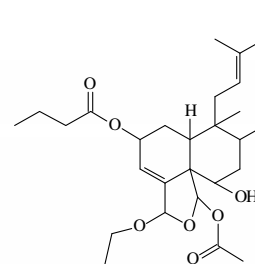
Gauss apodization 0.074 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.003 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 6 hr, 54 min, 54 sec



Fernando Passarelli FAS 4.2 amostra 11 07/07/09

Pulse Sequence: gHMOC

Solvent: piridina

Temp.: 30.0 C / 303.1 K

INNOVA-500 "multis"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.160 sec

Width 8387.7 Hz

2D Width 28027.6 Hz

90 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 499.3864551 MHz

DECOUPLE C13, 125.5678948 MHz

Power 47 dB

on during acquisition

off during delay

GARP-1 modulated

DATA PROCESSING

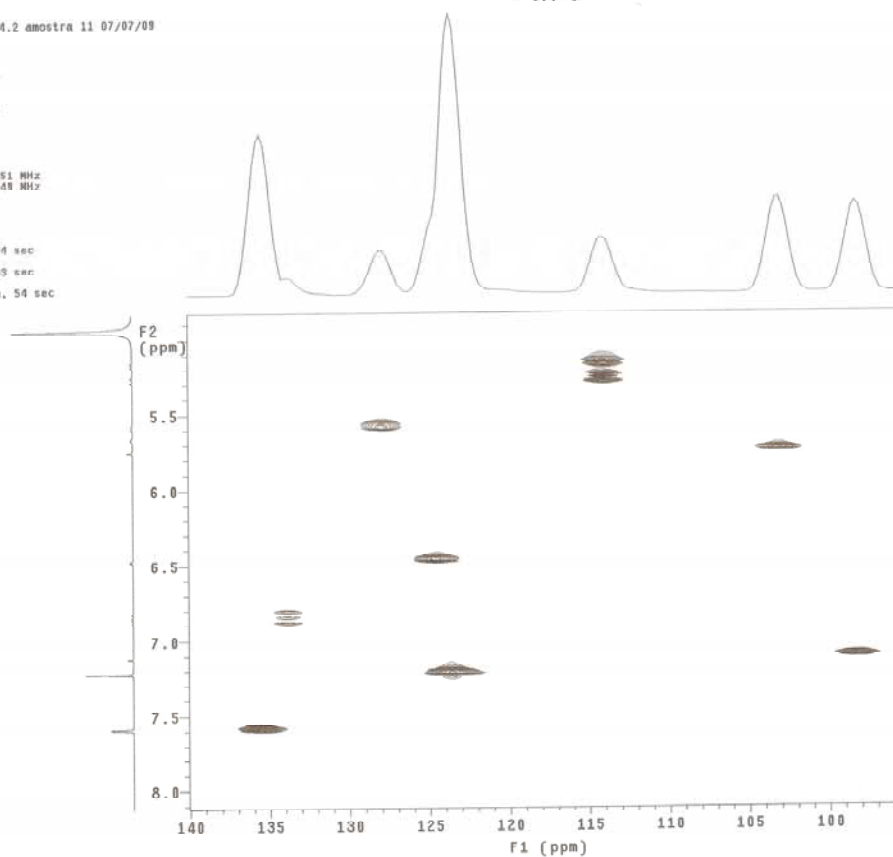
Gauss apodization 0.074 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.003 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 6 hr, 54 min, 54 sec



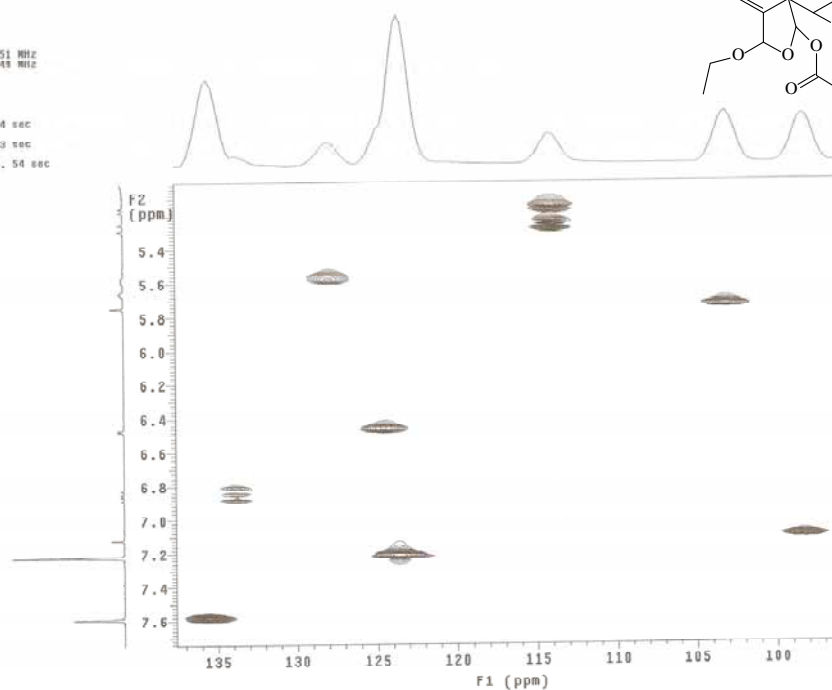
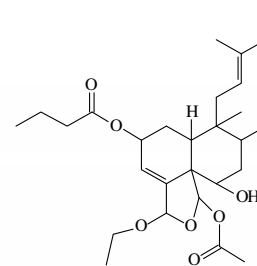
Anexo 36. Expansões do mapa de contorno gHMOC da casearina Z (piridina-d₅, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA3 4.2 amostra 11/07/09

Pulse Sequence: gHMQC

Solvent: pyridine
Temp: 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6387.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
99 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3864551 MHz
DECOUPLE C13, 125.5876944 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
QNP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 8.074 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 9.993 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 54 min, 54 sec



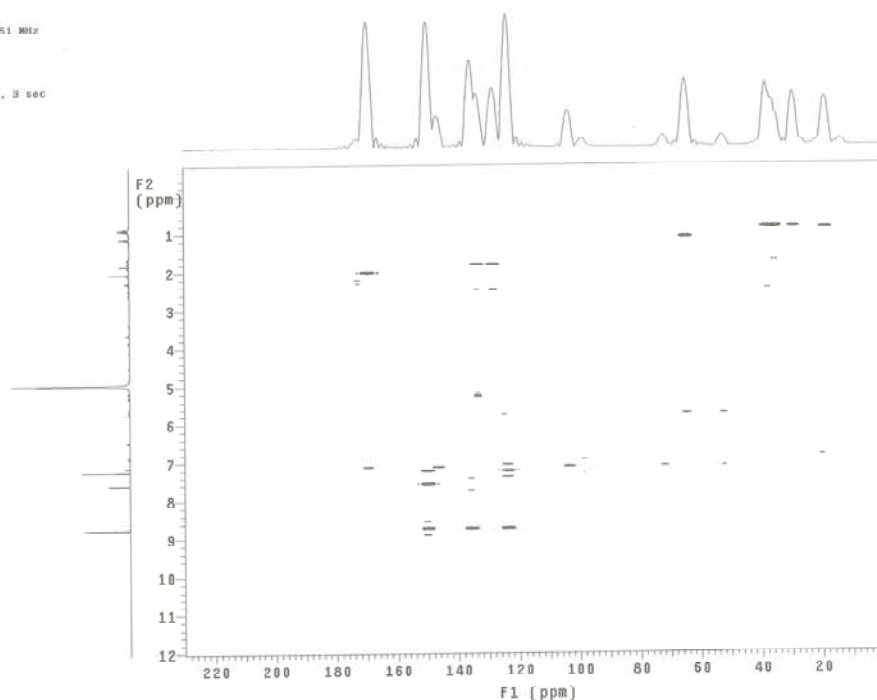
Anexo 37. Expansões do mapa de contorno gHMQC da casearina Z (piridina-d5, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA3 4.2 amostra 11/07/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine
Temp: 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6387.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
132 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3864551 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.080 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 51 min, 3 sec



Anexo 38. Mapa de contorno gHMBC da casearina Z (piridina-d5, 11,7 T).

Fernando Passarelli FAS 4.2 amostra 11 07/07/09

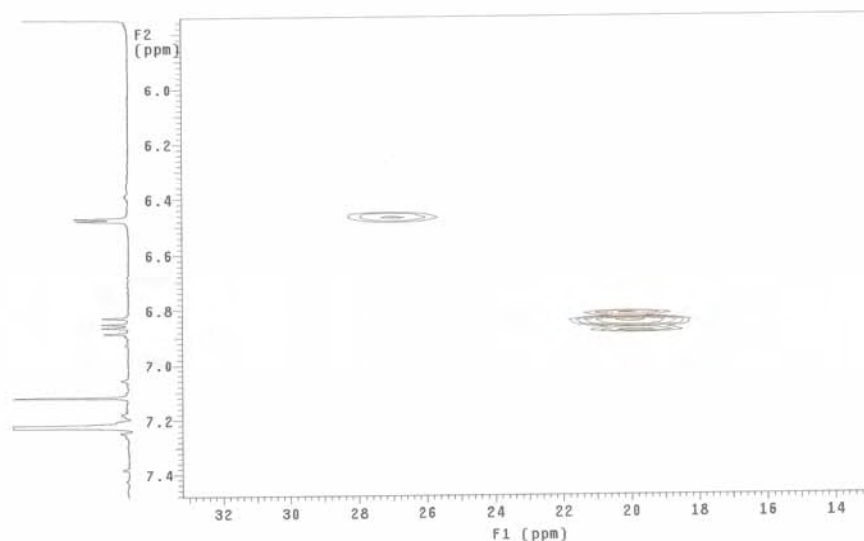
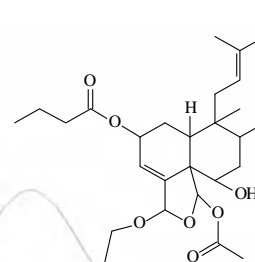
Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

INOVA-500 "multis" 1H

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6387.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
132 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3964551 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.080 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 51 min, 3 sec



Fernando Passarelli FAS 4.2 amostra 11 07/07/09

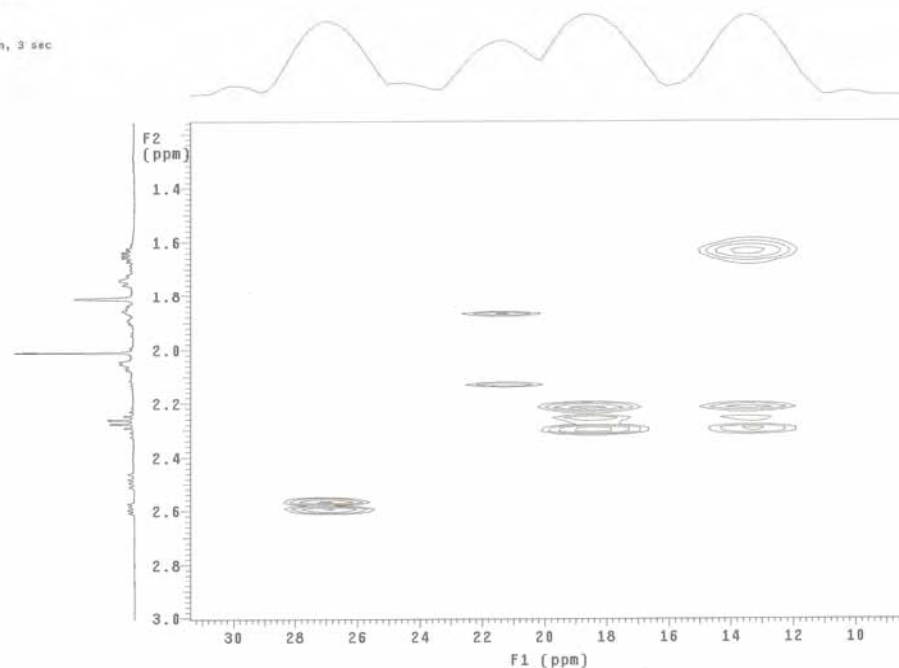
Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

INOVA-500 "multis" 1H

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6387.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
132 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3964551 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.080 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 51 min, 3 sec



Anexo 39. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina Z (piridina-d5, 11,7 T).

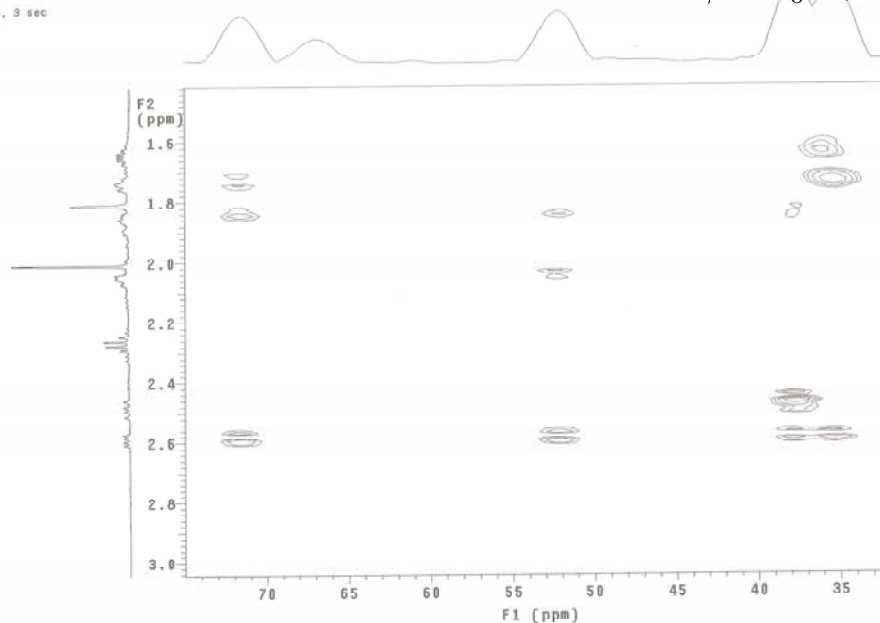
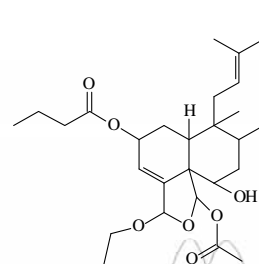
Fernando Passarelli FA9 4.2 amostra 11 07/07/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K

INOVA-500 "multisat"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6587.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
132 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3964551 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 51 min, 3 sec



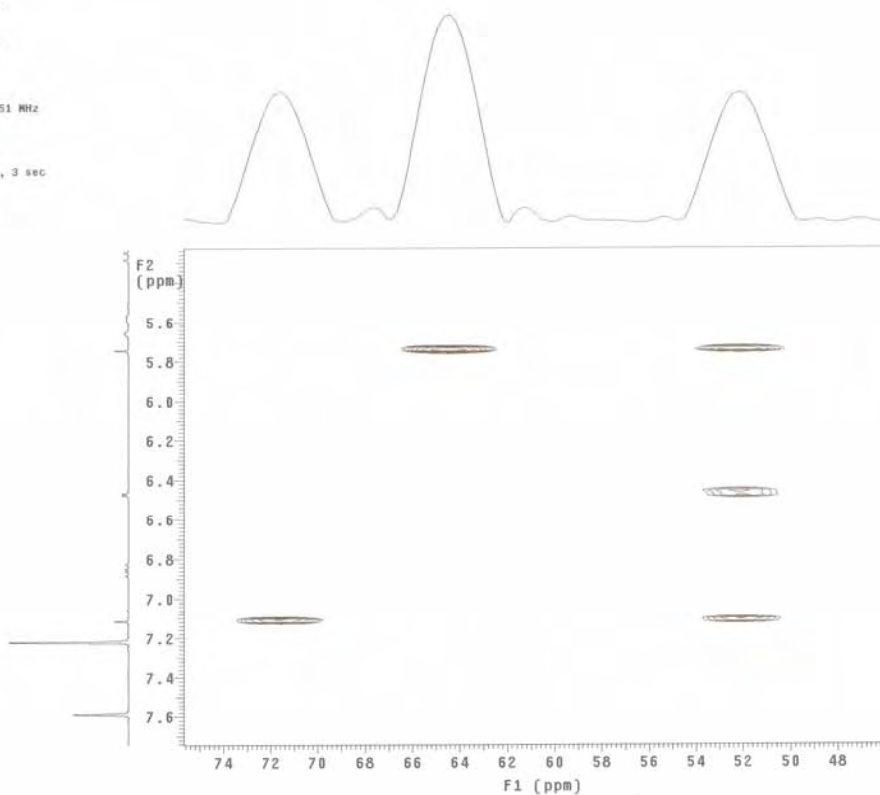
Fernando Passarelli FA9 4.2 amostra 11 07/07/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K

INOVA-500 "multisat"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6587.7 Hz
2D Width 29027.6 Hz
132 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3964551 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 51 min, 3 sec



Anexo 40. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina Z (piridina-d₅, 11,7 T).

Fernando Passarelli FAB 4.2 amostra 11 07/07/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

INNOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.160 sec

Width 8387.7 Hz

2D Width 29027.0 Hz

132 repetitions

128 increments

OBSERVE H1 499.3964551 MHz

DATA PROCESSING

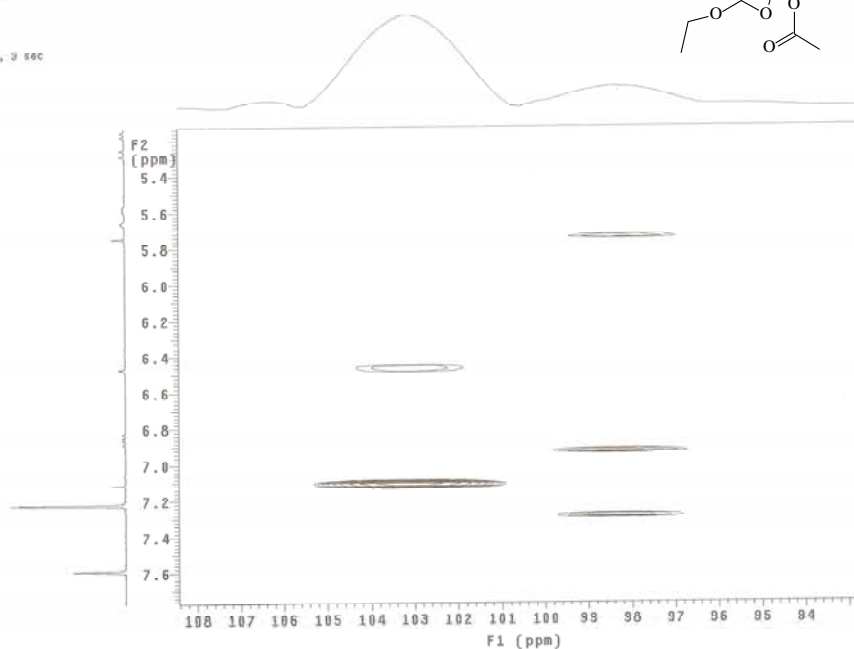
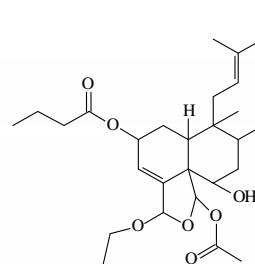
Sine bell 0.000 sec

F1 DATA PROCESSING

Sine bell 0.002 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 5 hr, 51 min, 3 sec



Fernando Passarelli FAB 4.2 amostra 11 07/07/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine

Temp. 30.0 C / 303.1 K

INNOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.160 sec

Width 8387.7 Hz

2D Width 29027.0 Hz

132 repetitions

128 increments

OBSERVE H1 499.3964551 MHz

DATA PROCESSING

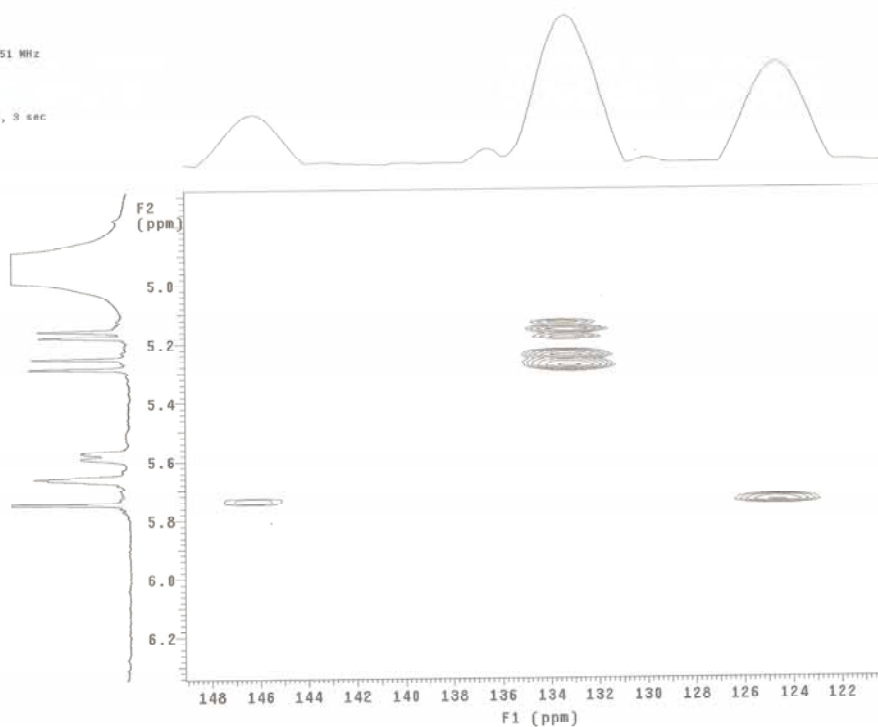
Sine bell 0.000 sec

F1 DATA PROCESSING

Sine bell 0.002 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 5 hr, 51 min, 3 sec



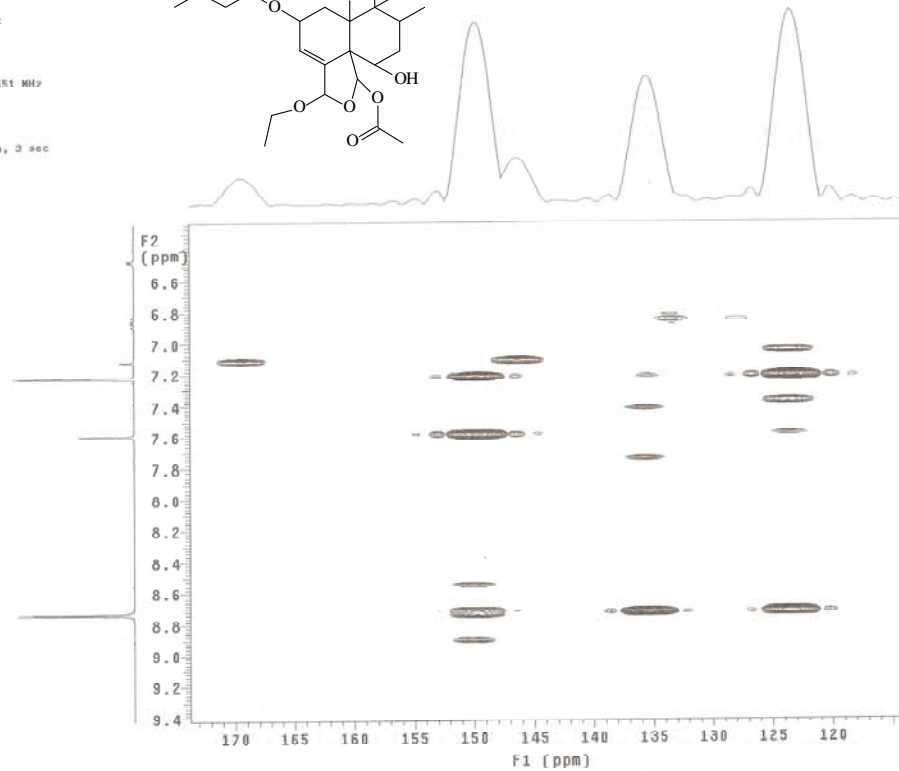
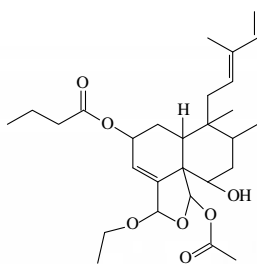
Anexo 41. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina Z (piridina-d5, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA9 4.2 amostra 11 07/07/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6307.7 Hz
2D Width 23027.6 Hz
132 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3864551 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
F1 size 2048 X 2048
Total time 5 hr, 51 min, 2 sec

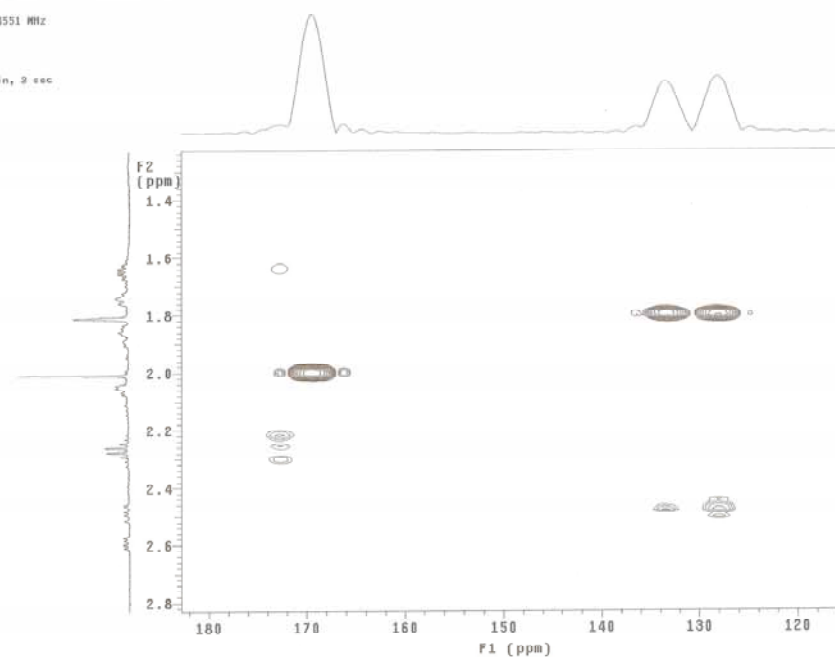


Fernando Passarelli FA9 4.2 amostra 11 07/07/09

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6307.7 Hz
2D Width 23027.6 Hz
132 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3864551 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
F1 size 2048 X 2048
Total time 5 hr, 51 min, 2 sec



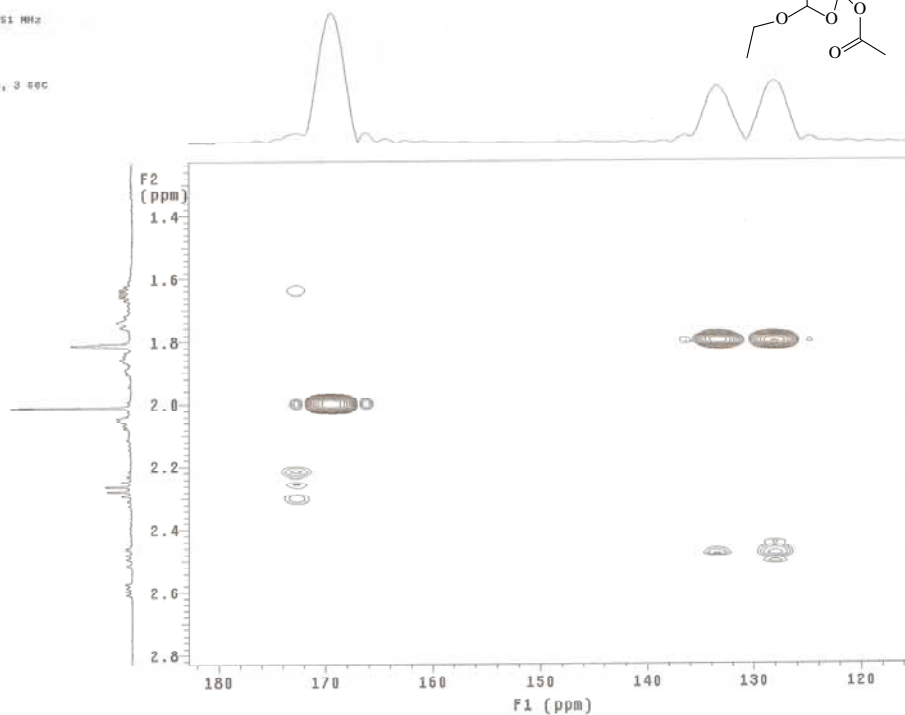
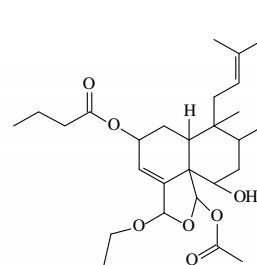
Anexo 42. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina Z (piridina-d5, 11,7 T).

Fernando Passarelli FA9 4.2 amostra 11/07/09

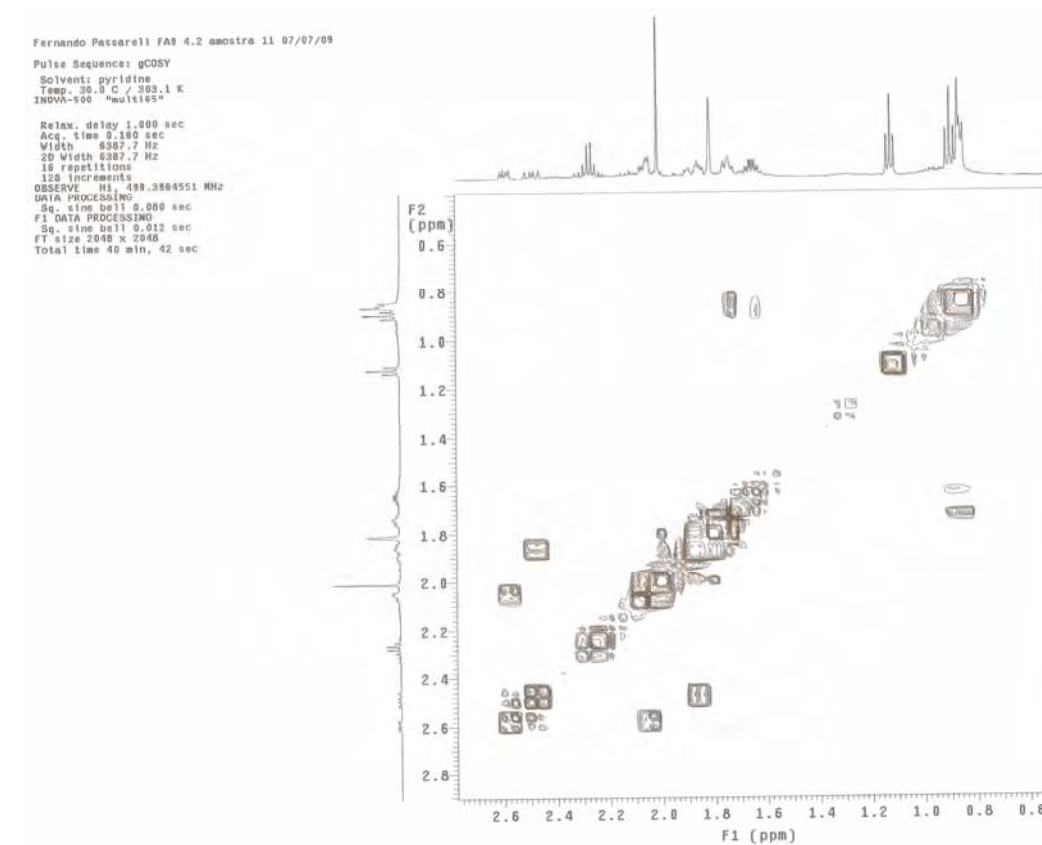
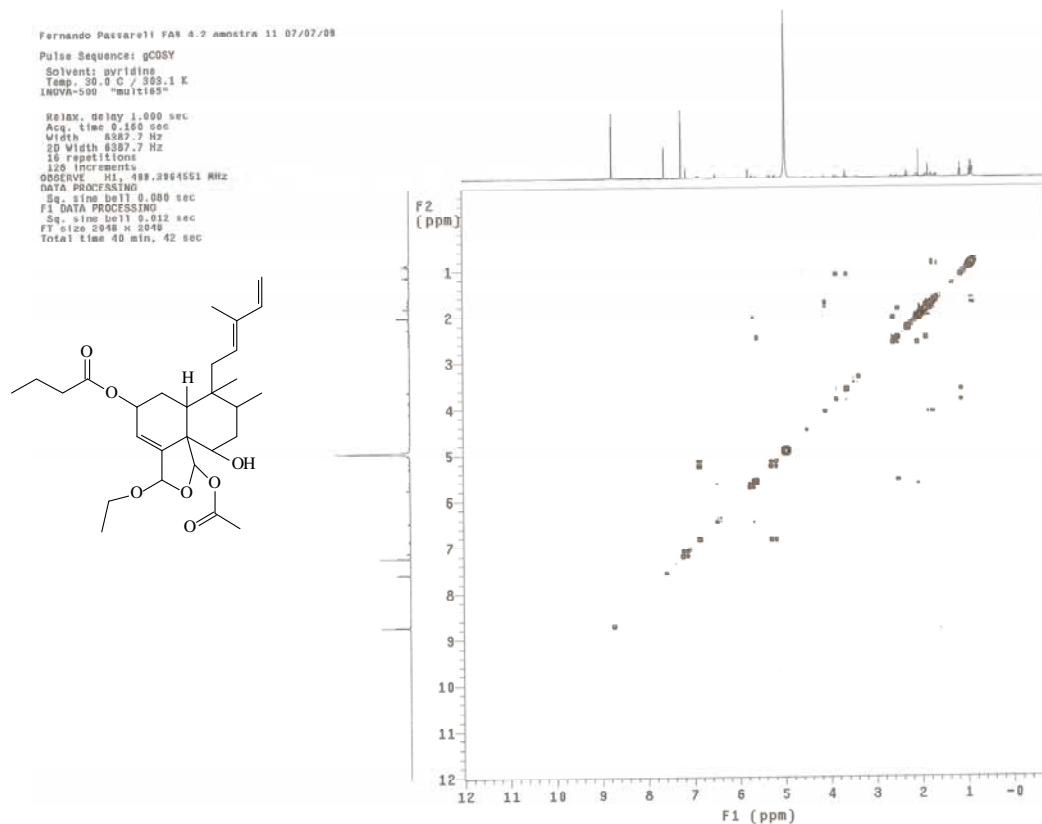
Pulse sequence: gHMBC

Solvent: pyridine
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multispec"

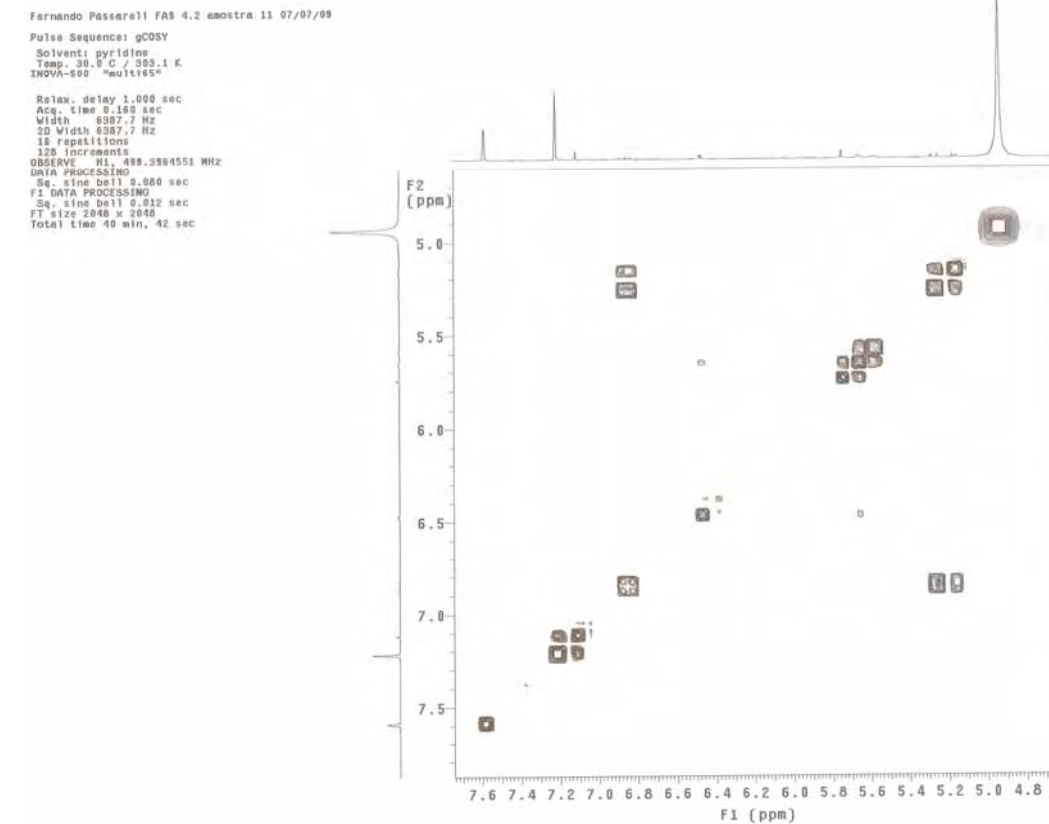
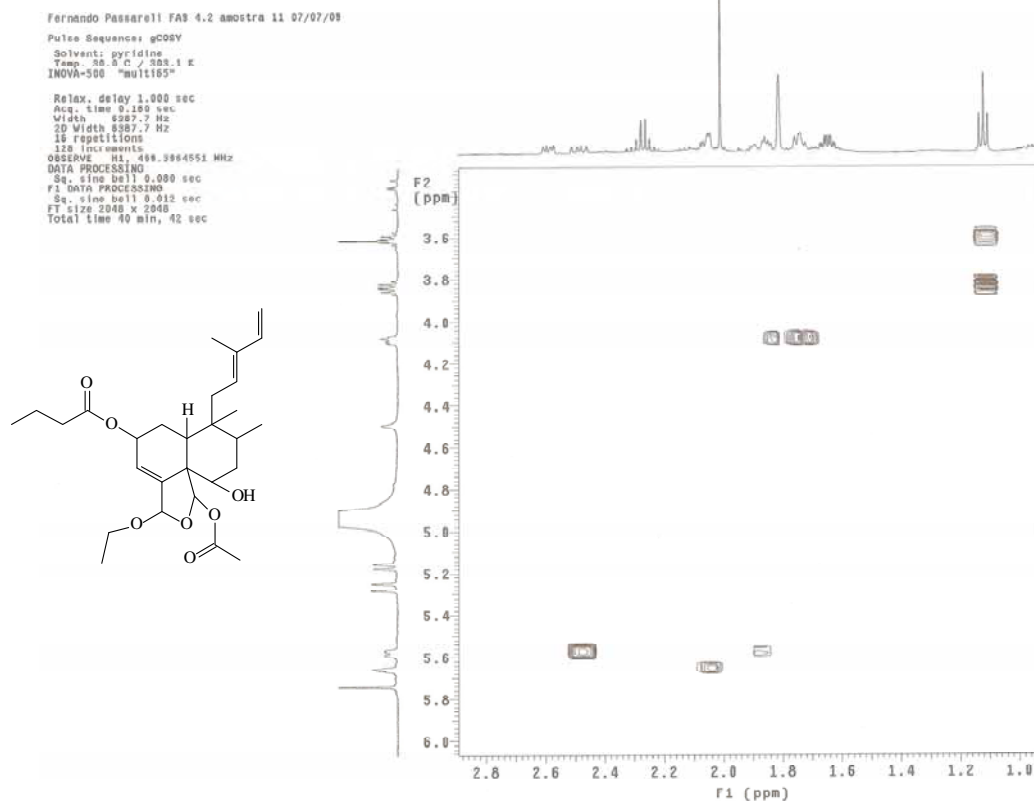
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.160 sec
Width 6387.7 Hz
F2 Width 23027.9 Hz
132 repetitions
120 increments
OBSERVE H1 499.284551 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.080 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 51 min, 3 sec



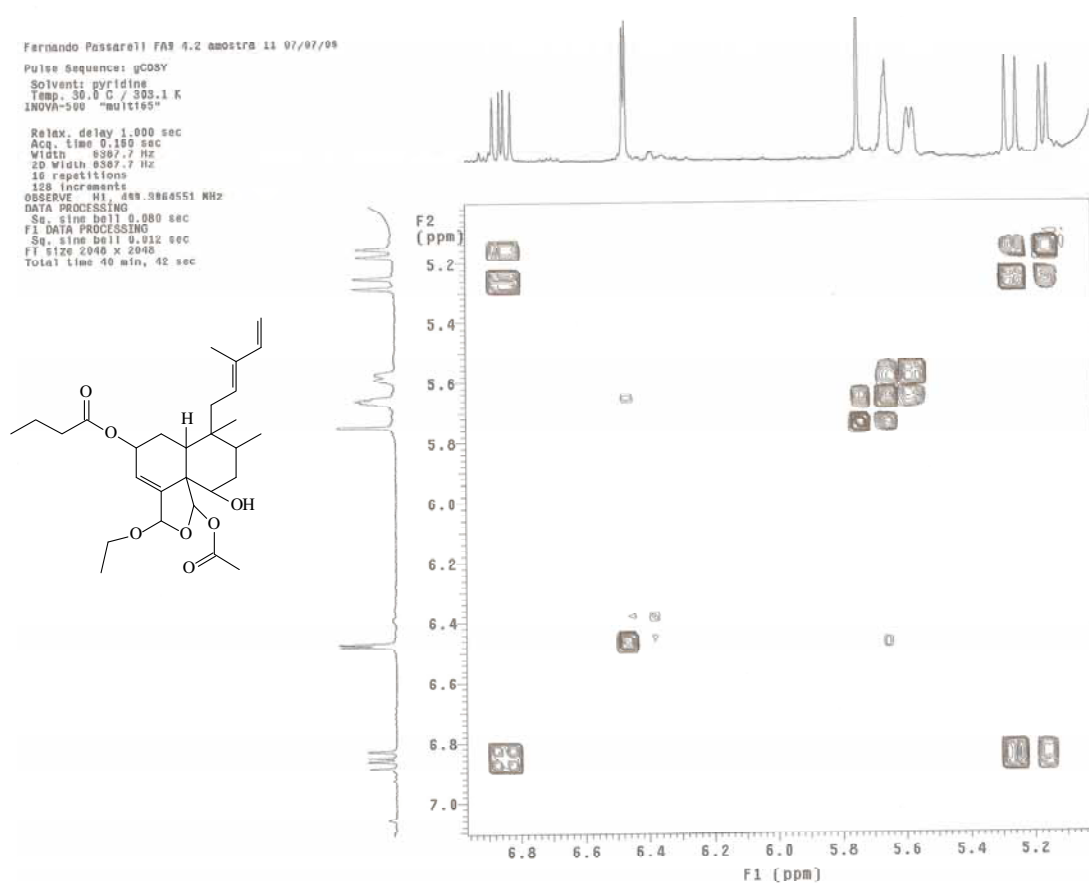
Anexo 43. Expansões do mapa de contorno gHMBC da casearina Z (piridina-d₅, 11,7 T).



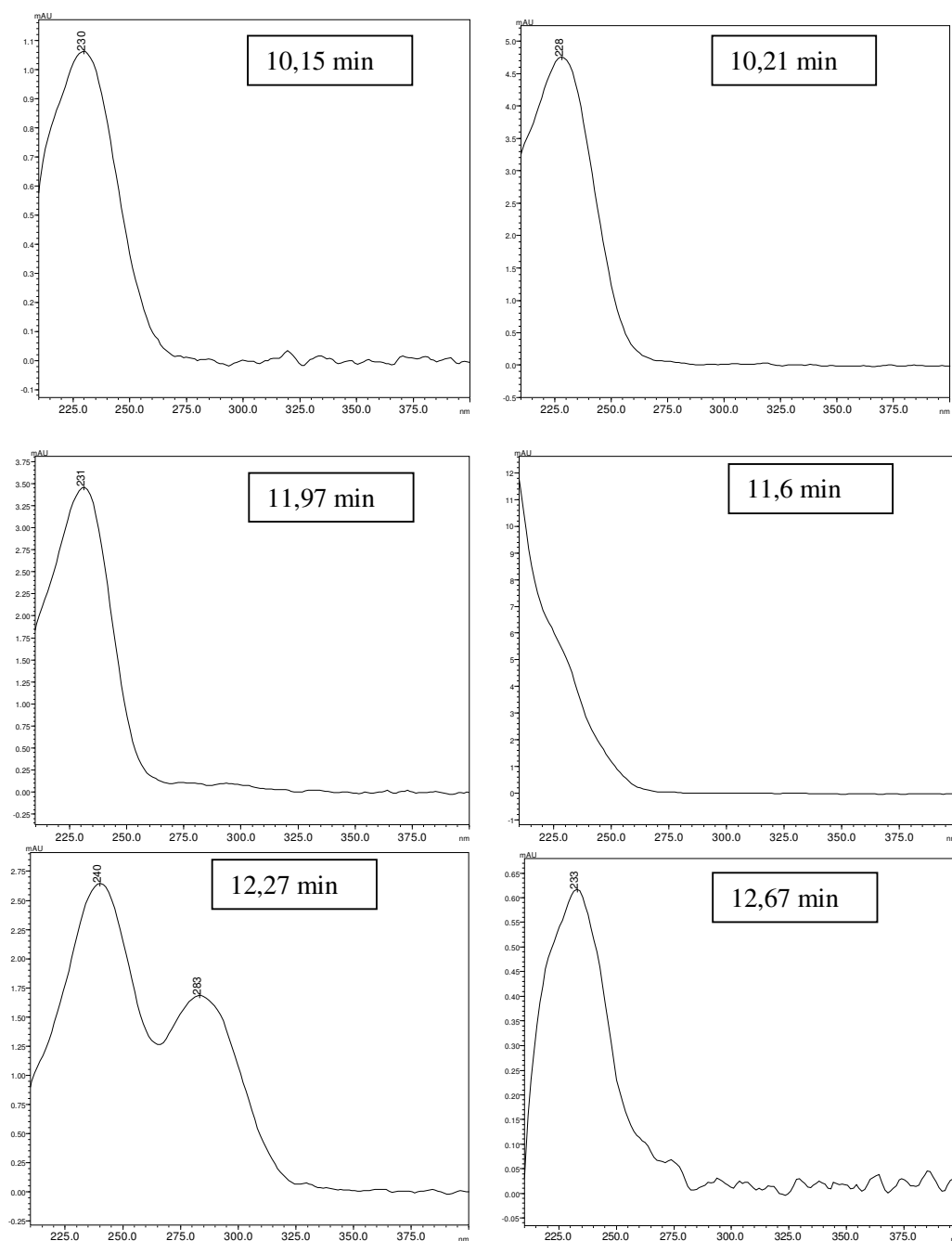
Anexo 44. Mapa de contornos gCOSY e expansão da casearina Z (piridina-d₅, 11,7 T).



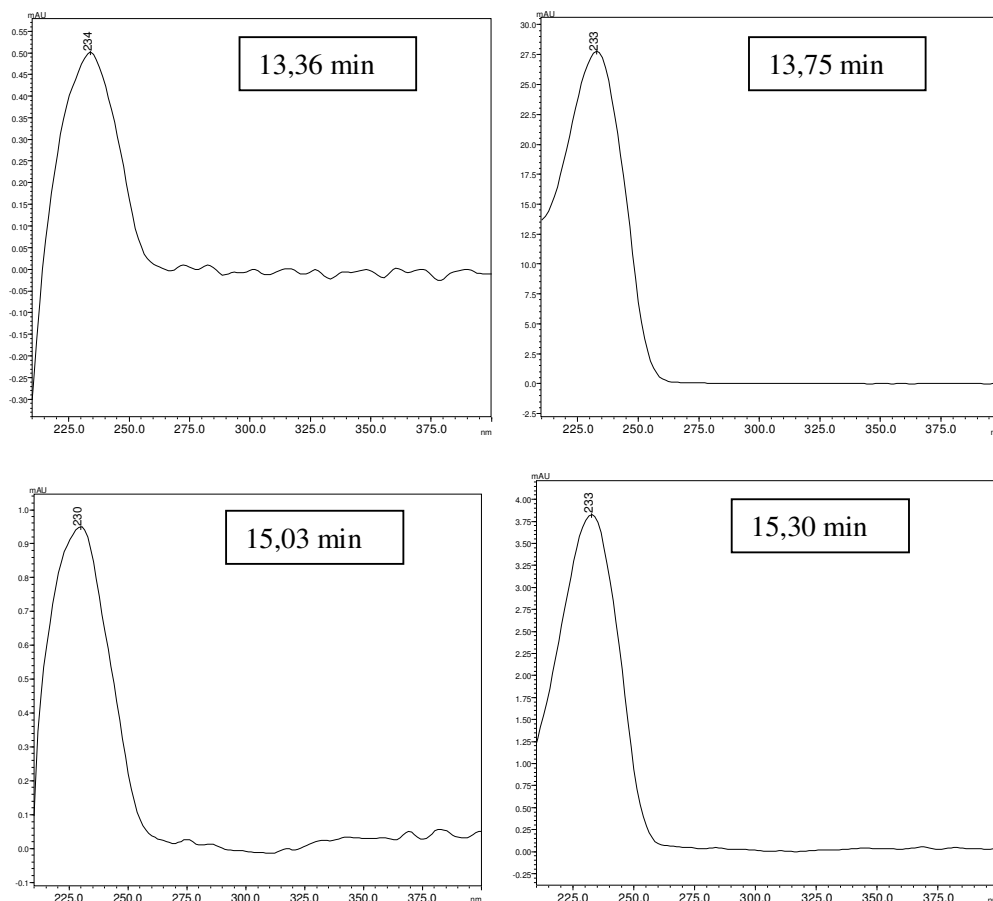
Anexo 45. Expansões do mapa de contornos gCOSY da casearina Z (piridina-d₅, 11,7 T).



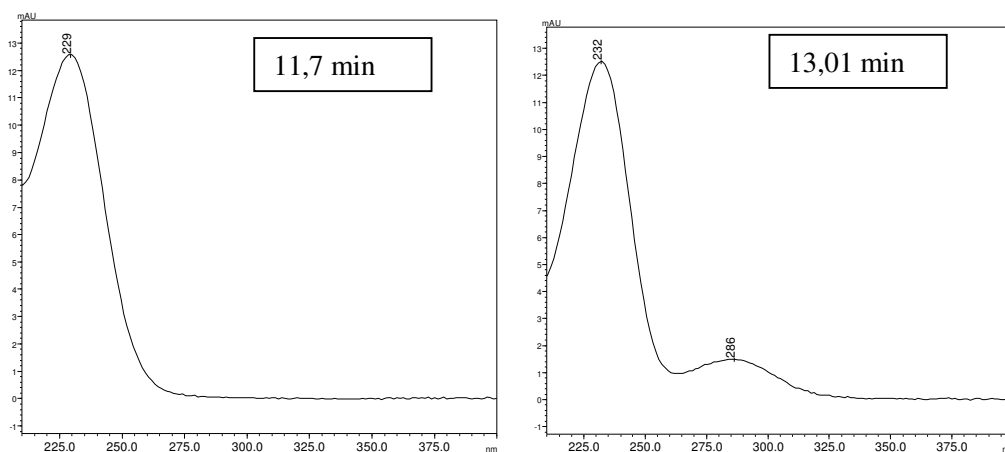
Anexo 46. Expansão do mapa de contornos gCOSY da casearina Z (piridina- d_5 , 11,7 T).



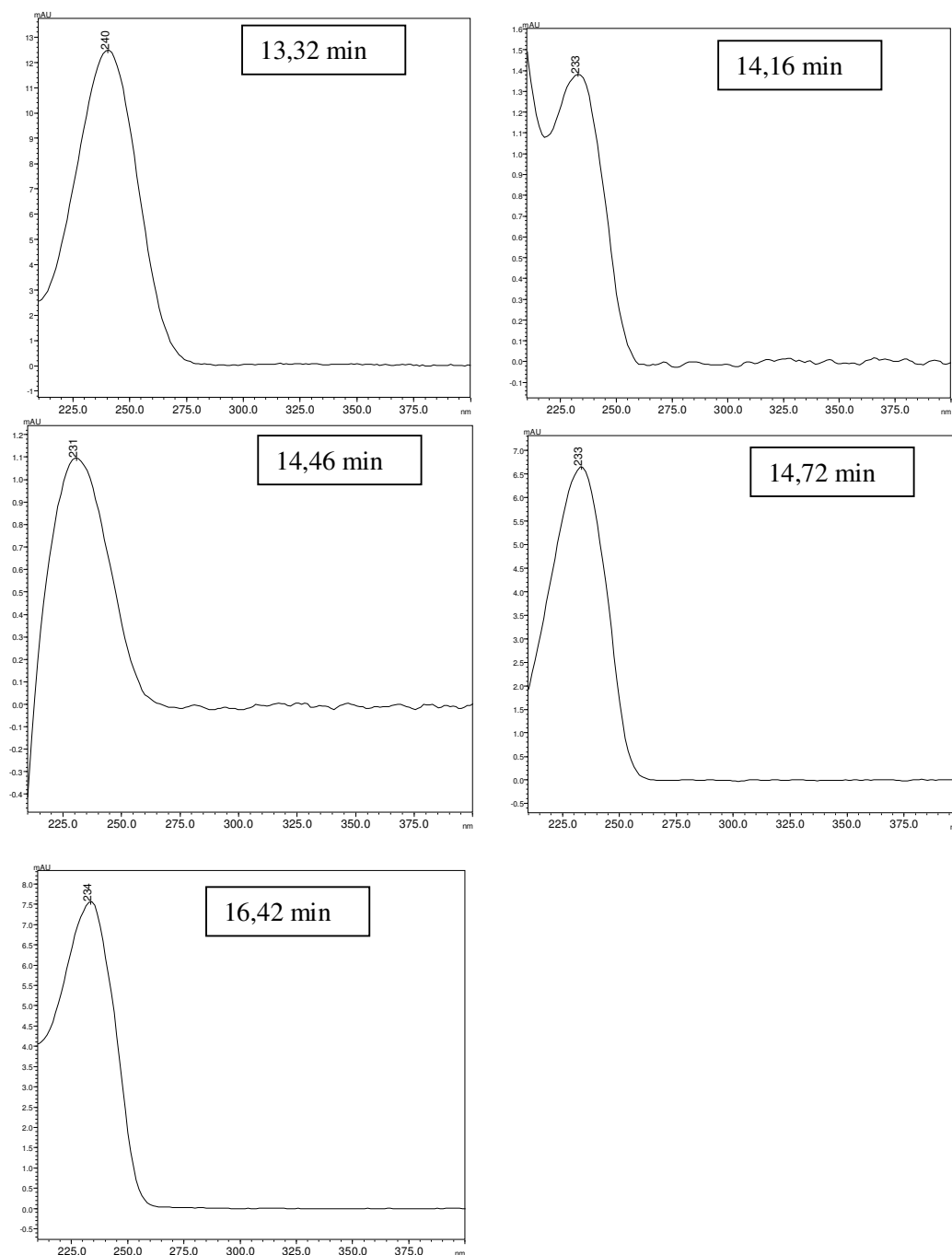
Anexo 47. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 32 obtidos pela análise em coluna fenil-hexil, os tempos de retenção estão indicados nas figuras acima.



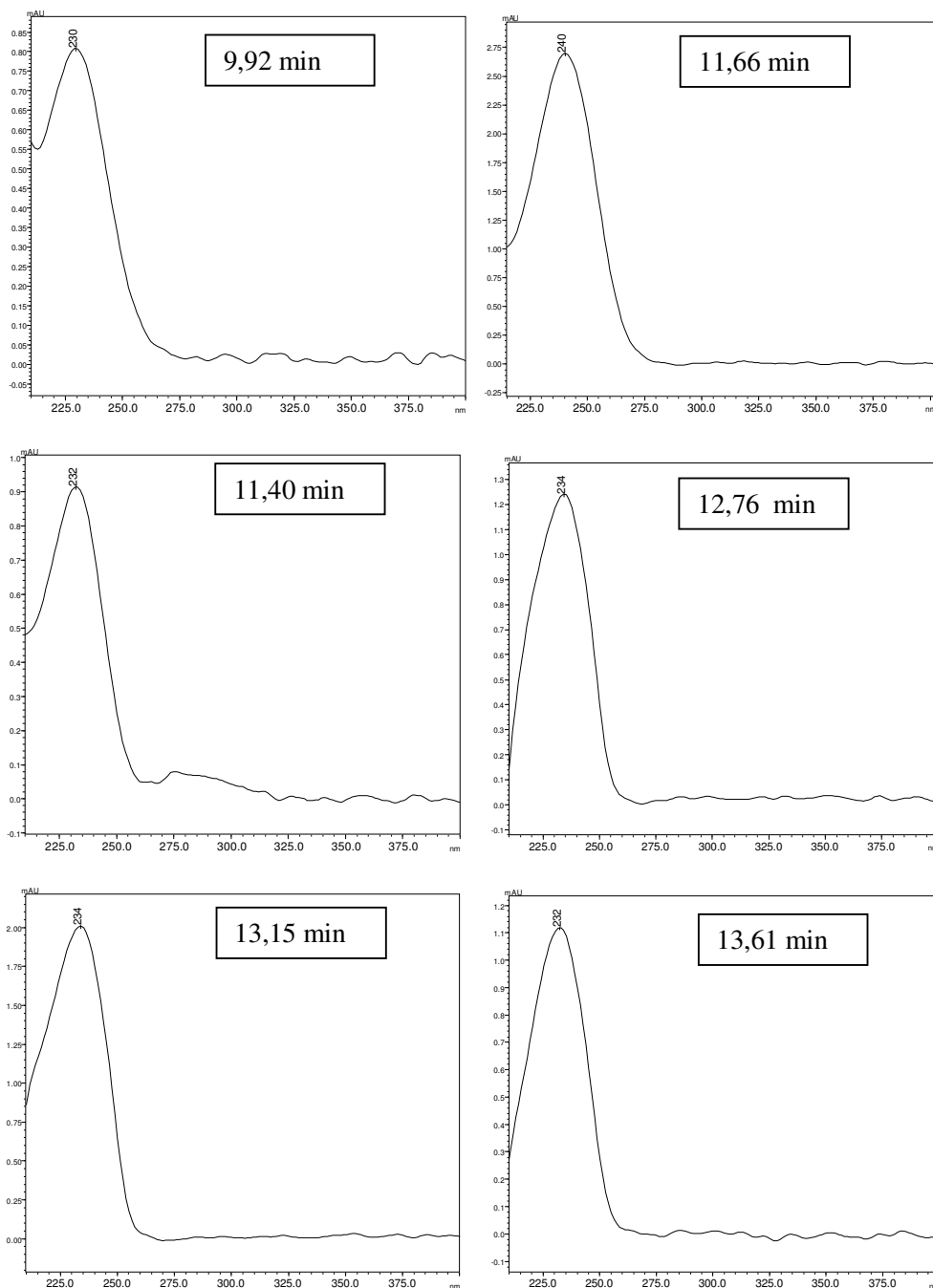
Anexo 48. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 32 obtidos pela análise em coluna fenil-hexil, os tempos de retenção estão indicado nas figuras acima.



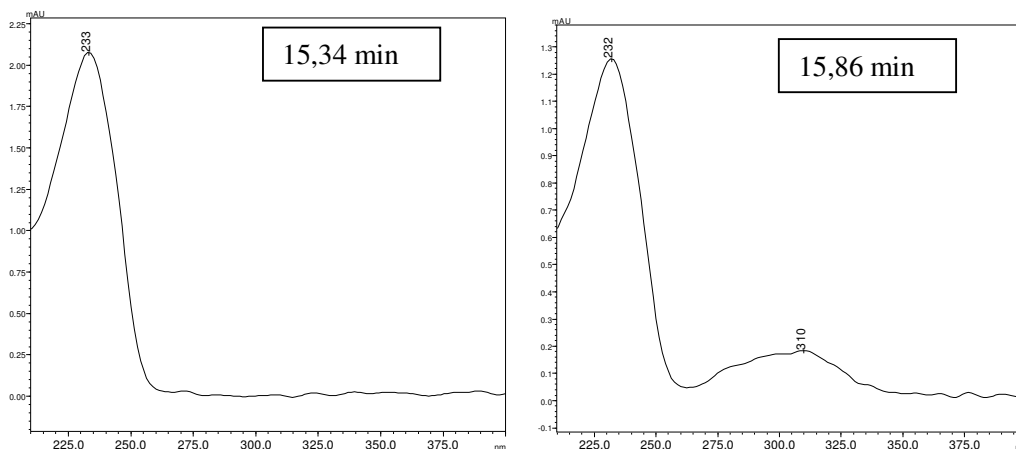
Anexo 49. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 33 obtidos pela análise em coluna fenil-hexil, os tempos de retenção estão indicado nas figuras acima.



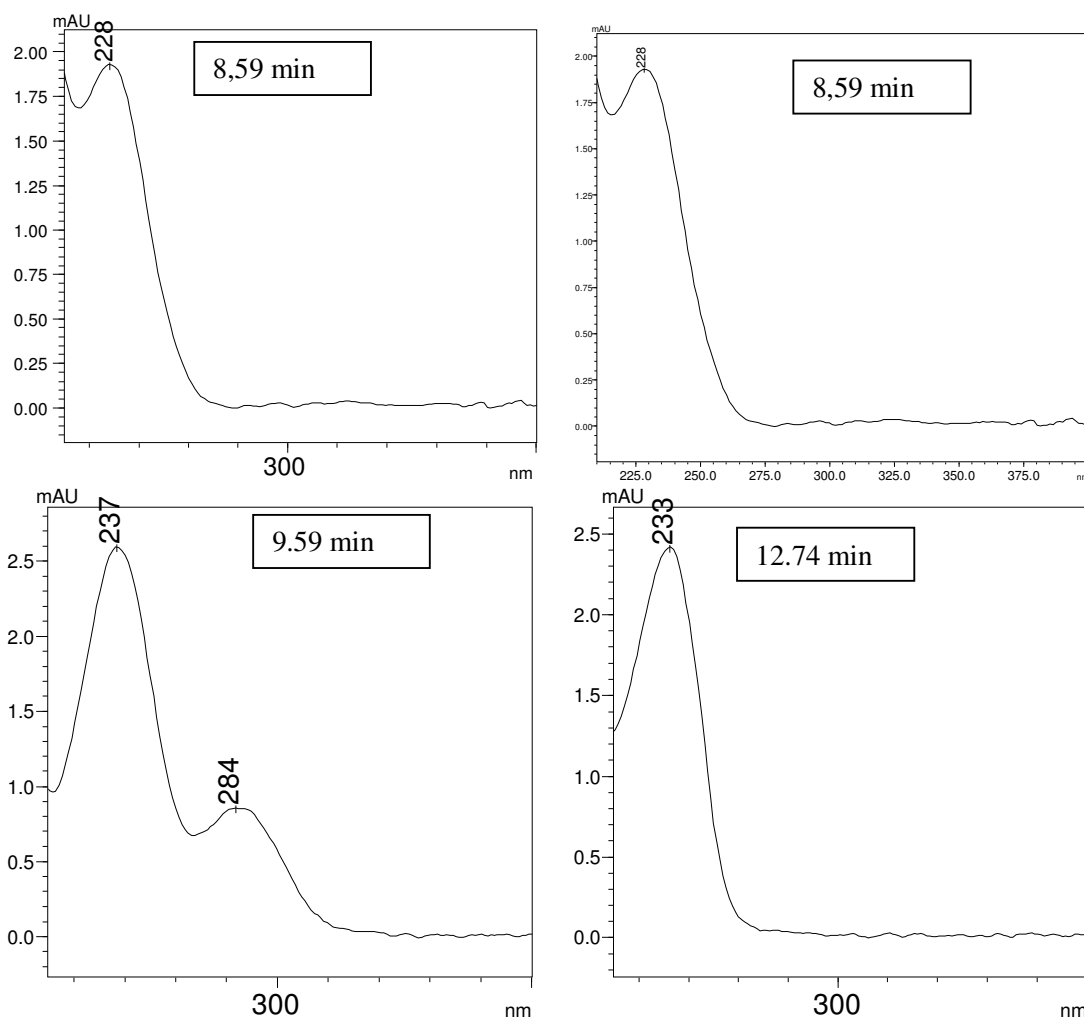
Anexo 50. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 33 obtidos pela análise em coluna fenil-hexil, os tempos de retenção estão indicado nas figuras acima.



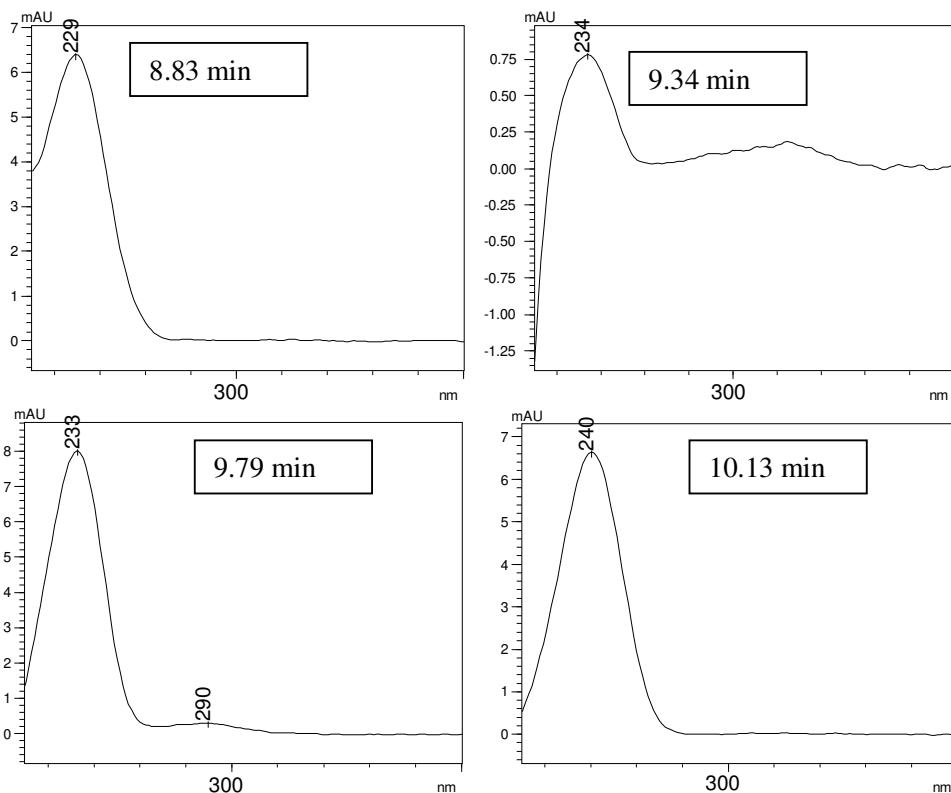
Anexo 51. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 34 obtidos pela análise em coluna fenil-hexil, os tempos de retenção estão indicados nas figuras acima.



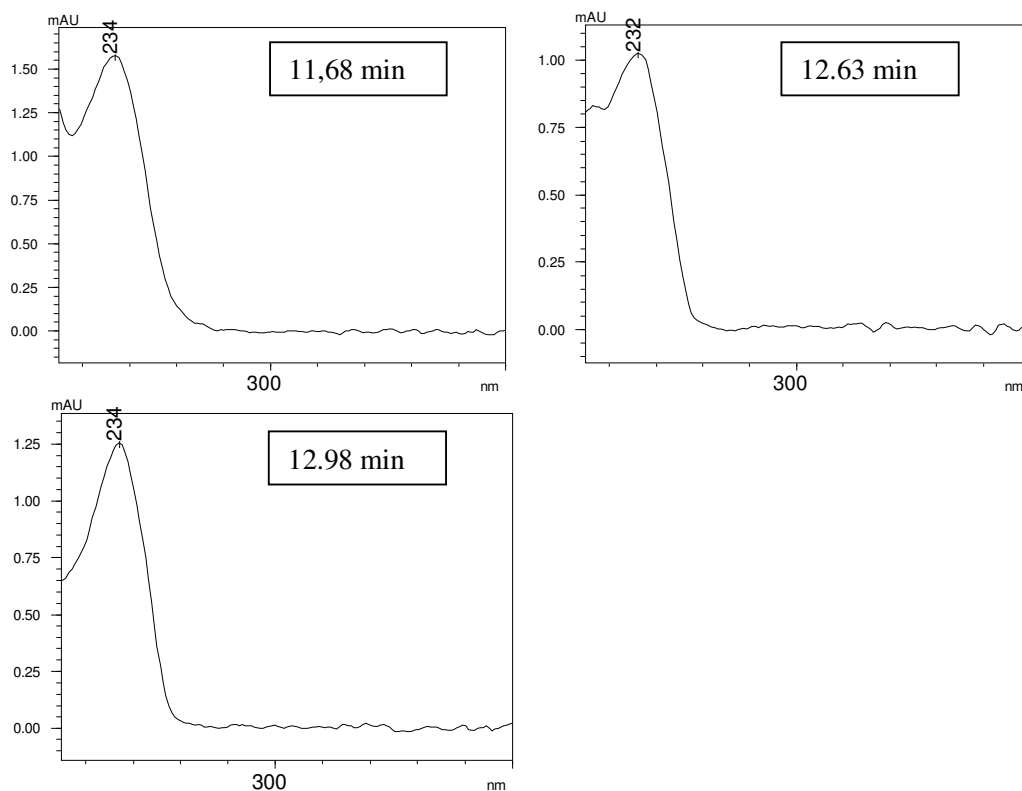
Anexo 52. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 34 obtidos pela análise em coluna fenil-hexil, os tempos de retenção estão indicados nas figuras acima.



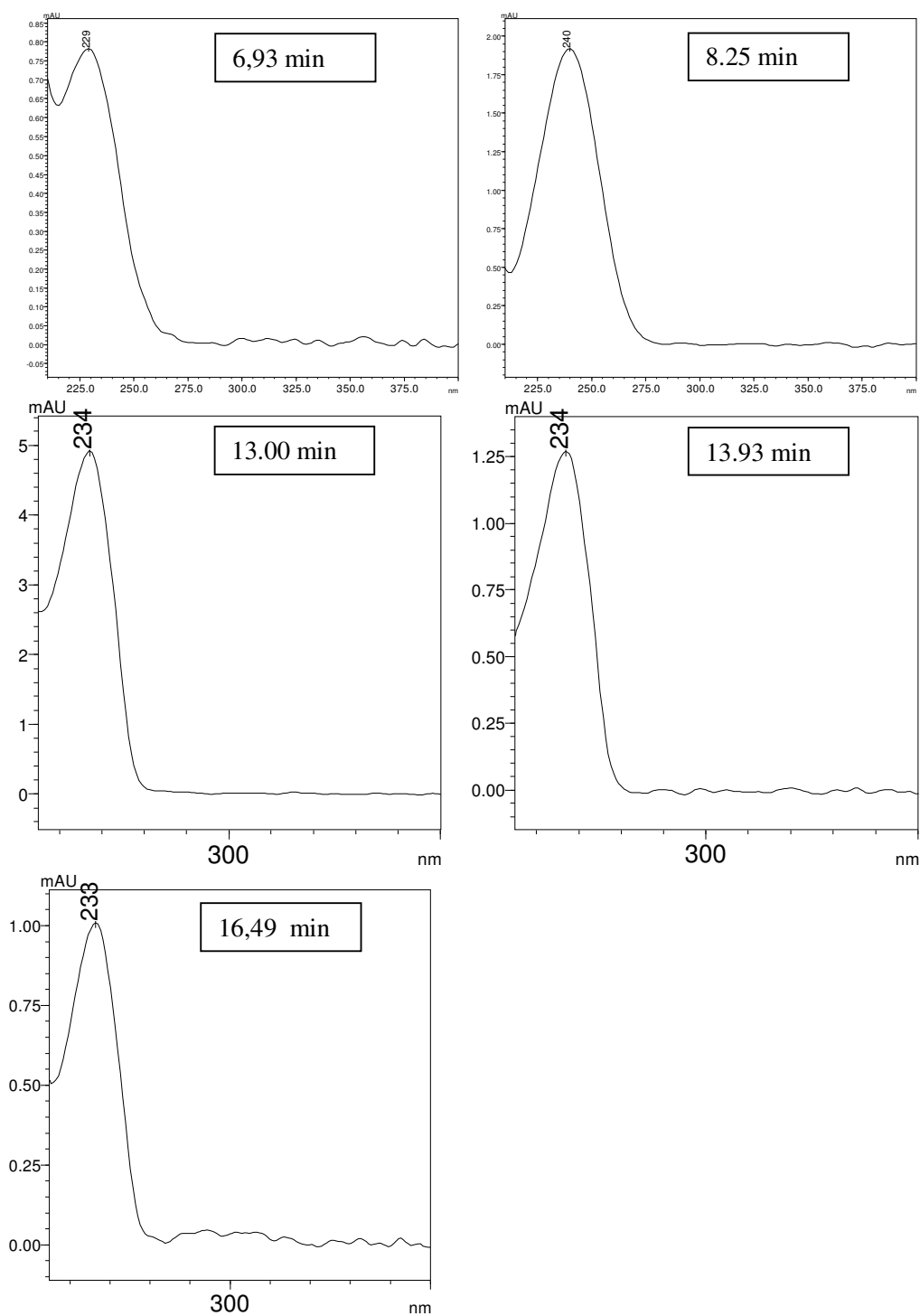
Anexo 53. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 32 obtidos pela análise em coluna C18, os tempos de retenção estão indicados nas figuras acima.



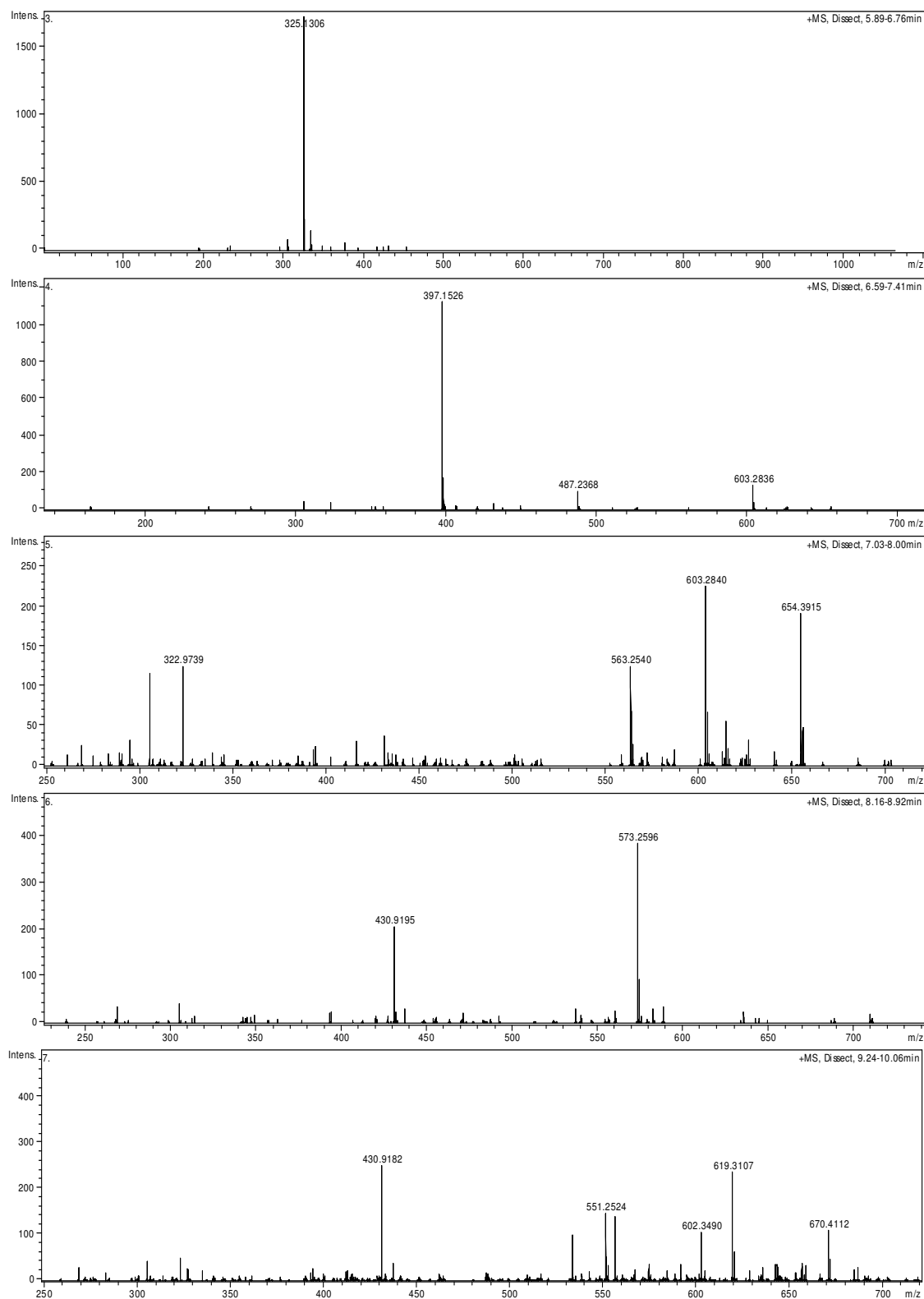
Anexo 54. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 33 obtidos pela análise em coluna C18, os tempos de retenção estão indicados nas figuras acima.



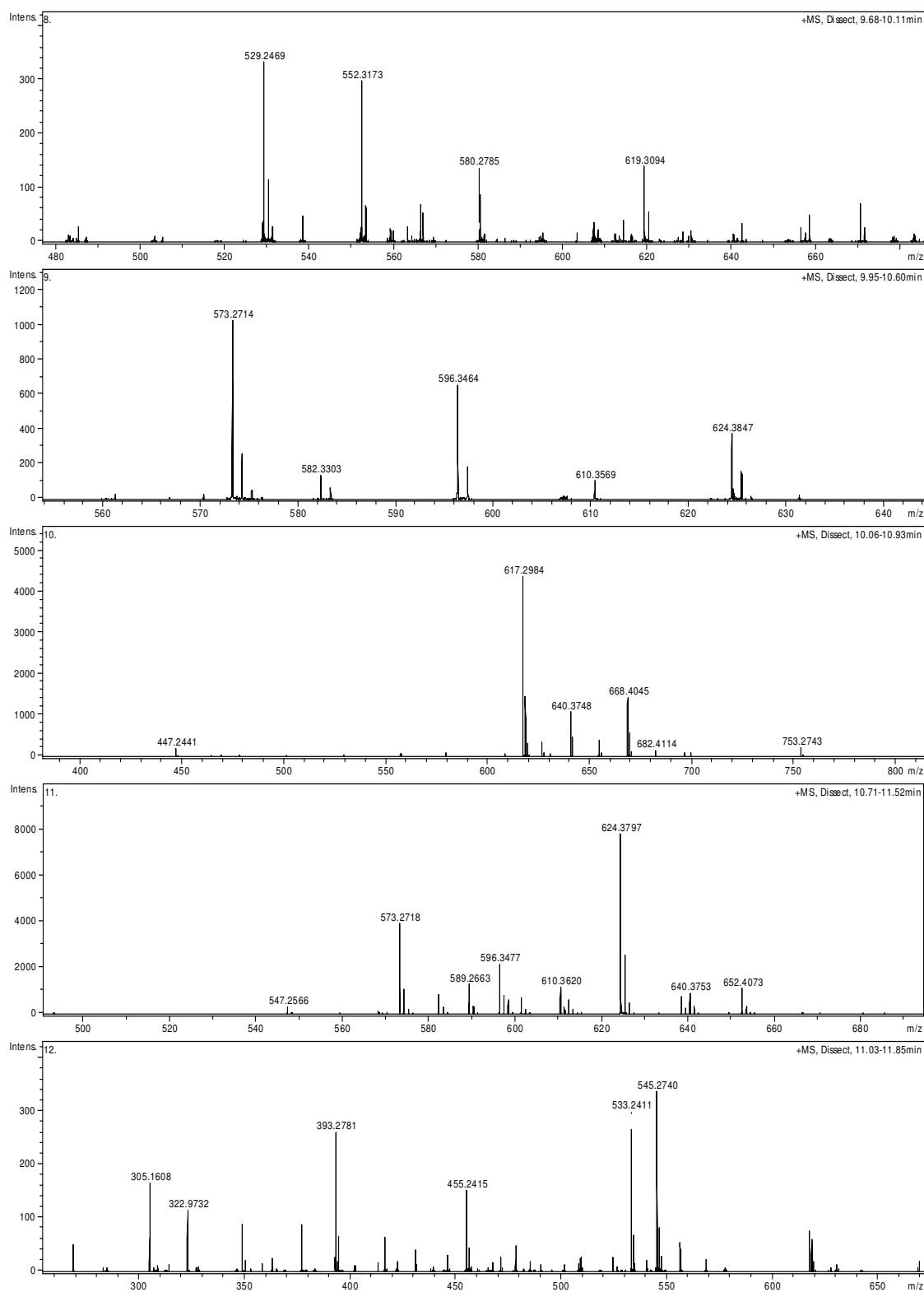
Anexo 55. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 33 obtidos pela análise em coluna C18, os tempos de retenção estão indicados nas figuras acima.



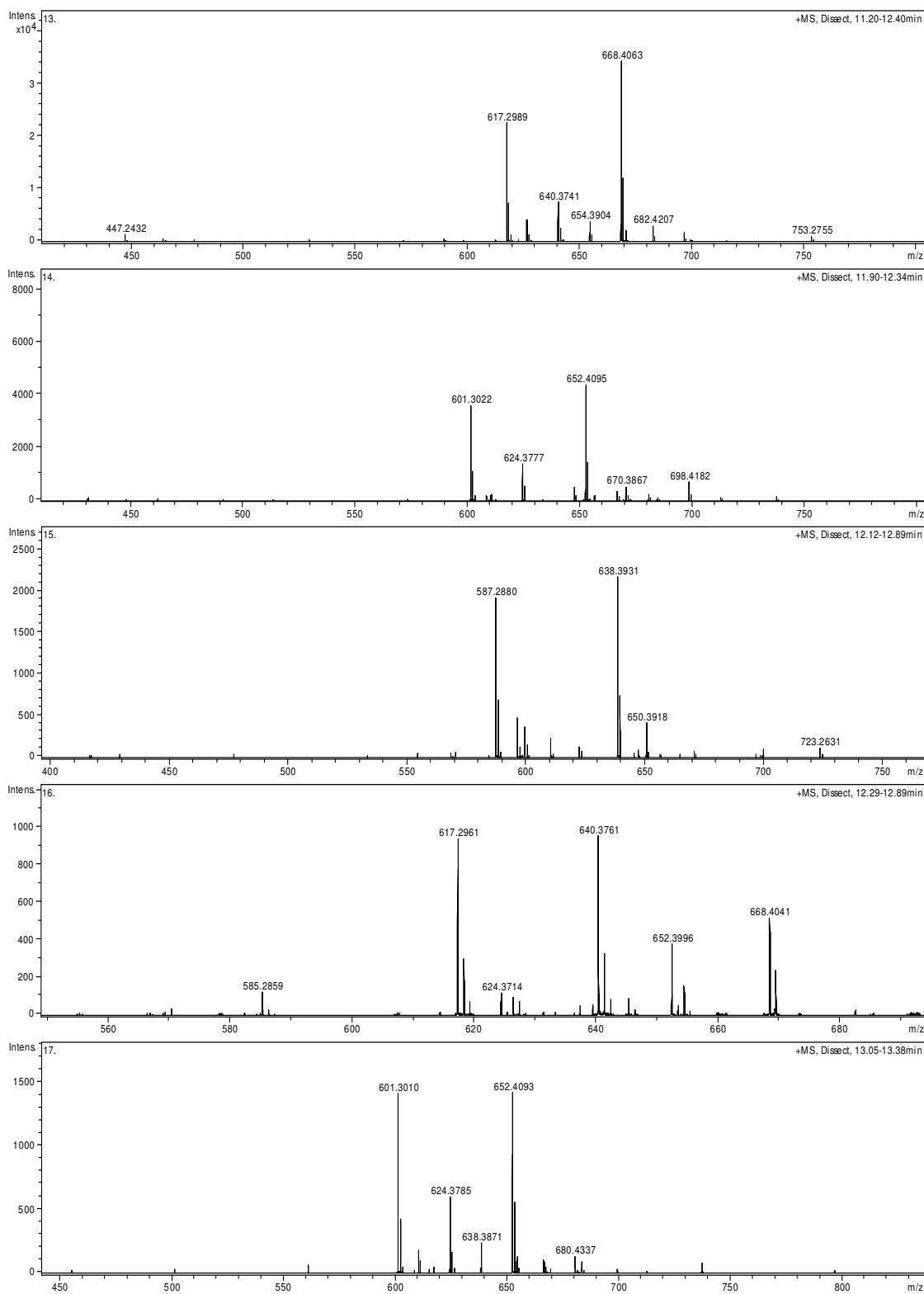
Anexo 56. Espectro de absorção no UV dos picos indicados no cromatograma da figura 34 obtidos pela análise em coluna C18, os tempos de retenção estão indicado nas figuras acima.



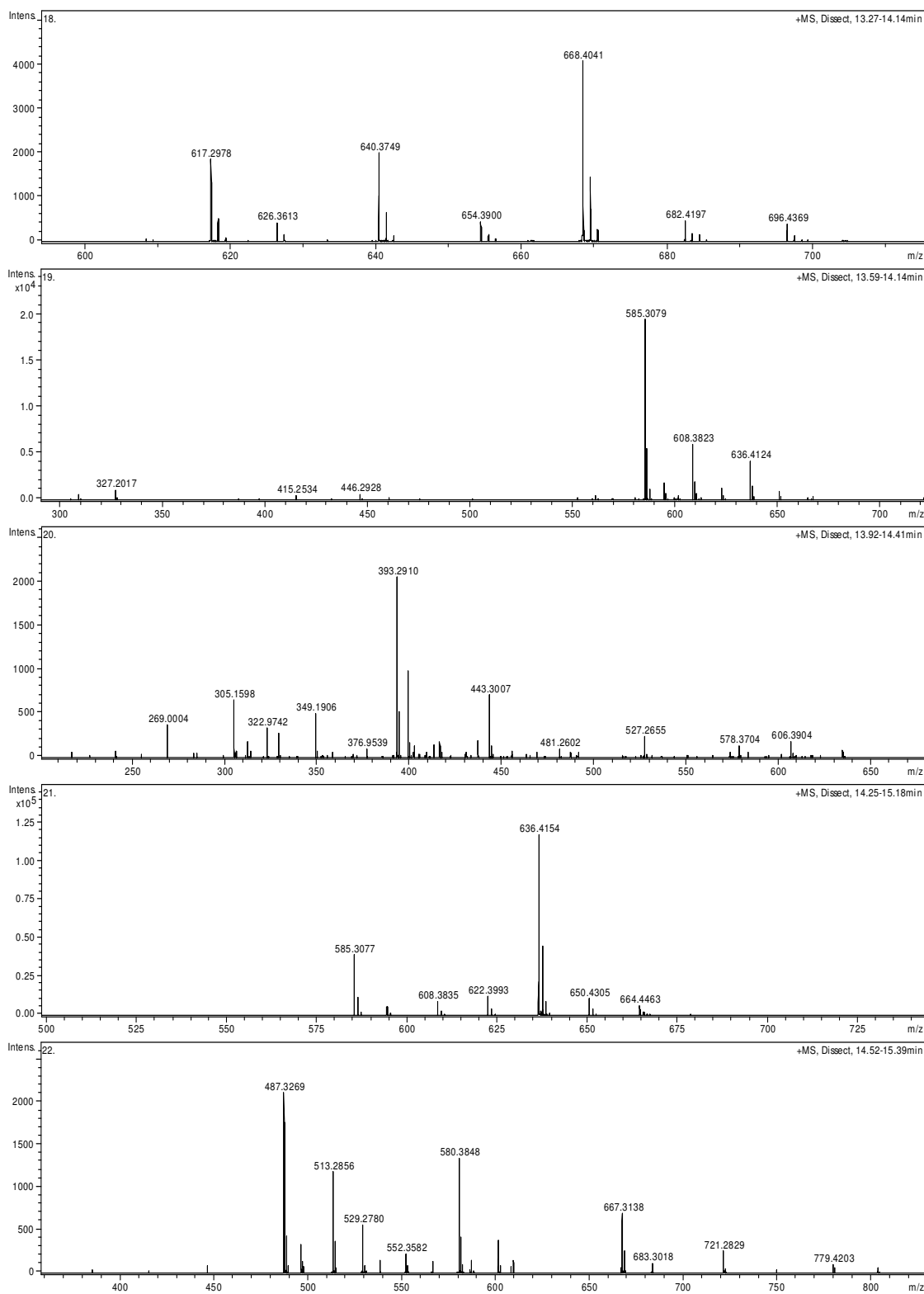
Anexo 57. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna fenil-hexil.



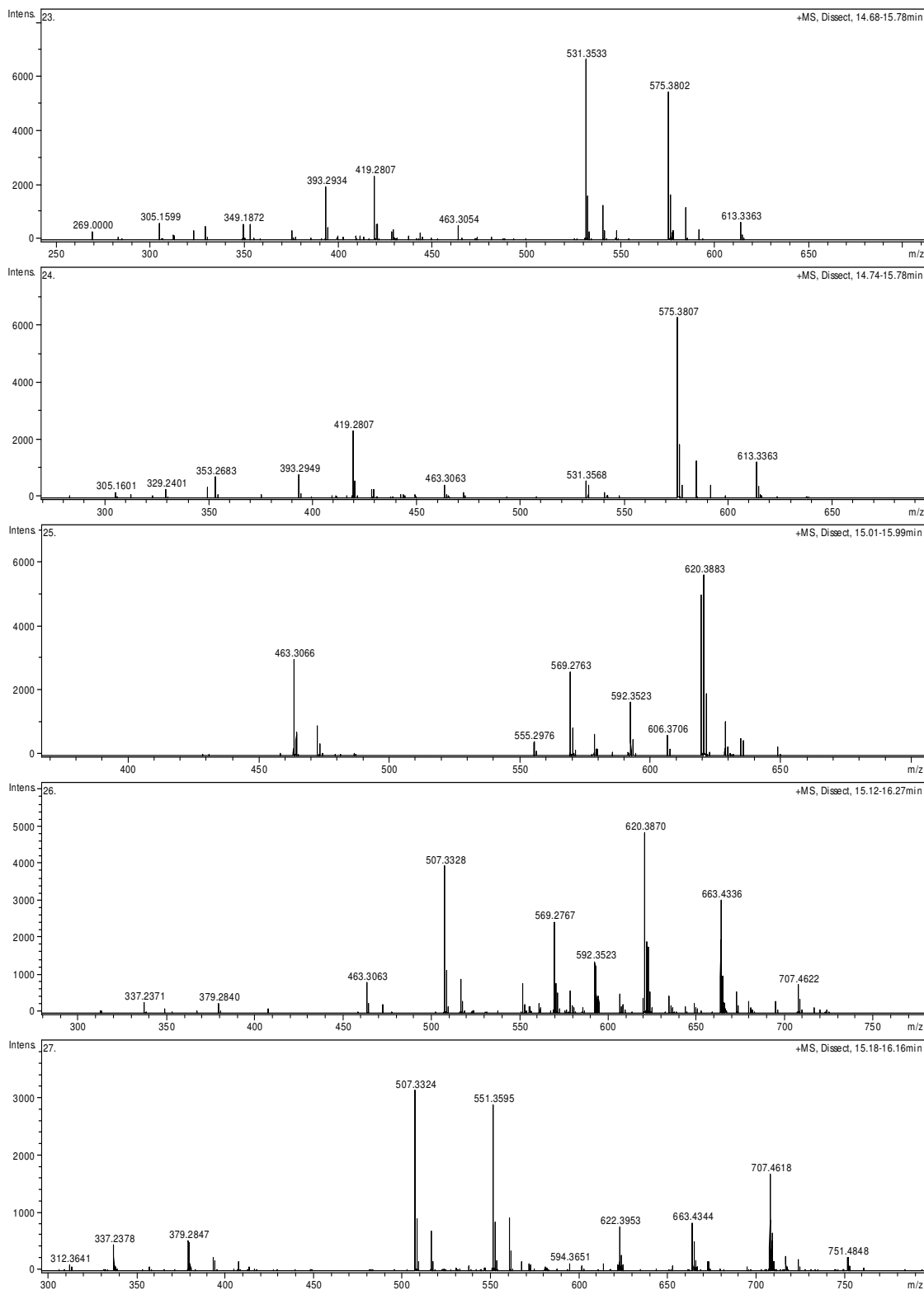
Anexo 58. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna fenil-hexil.



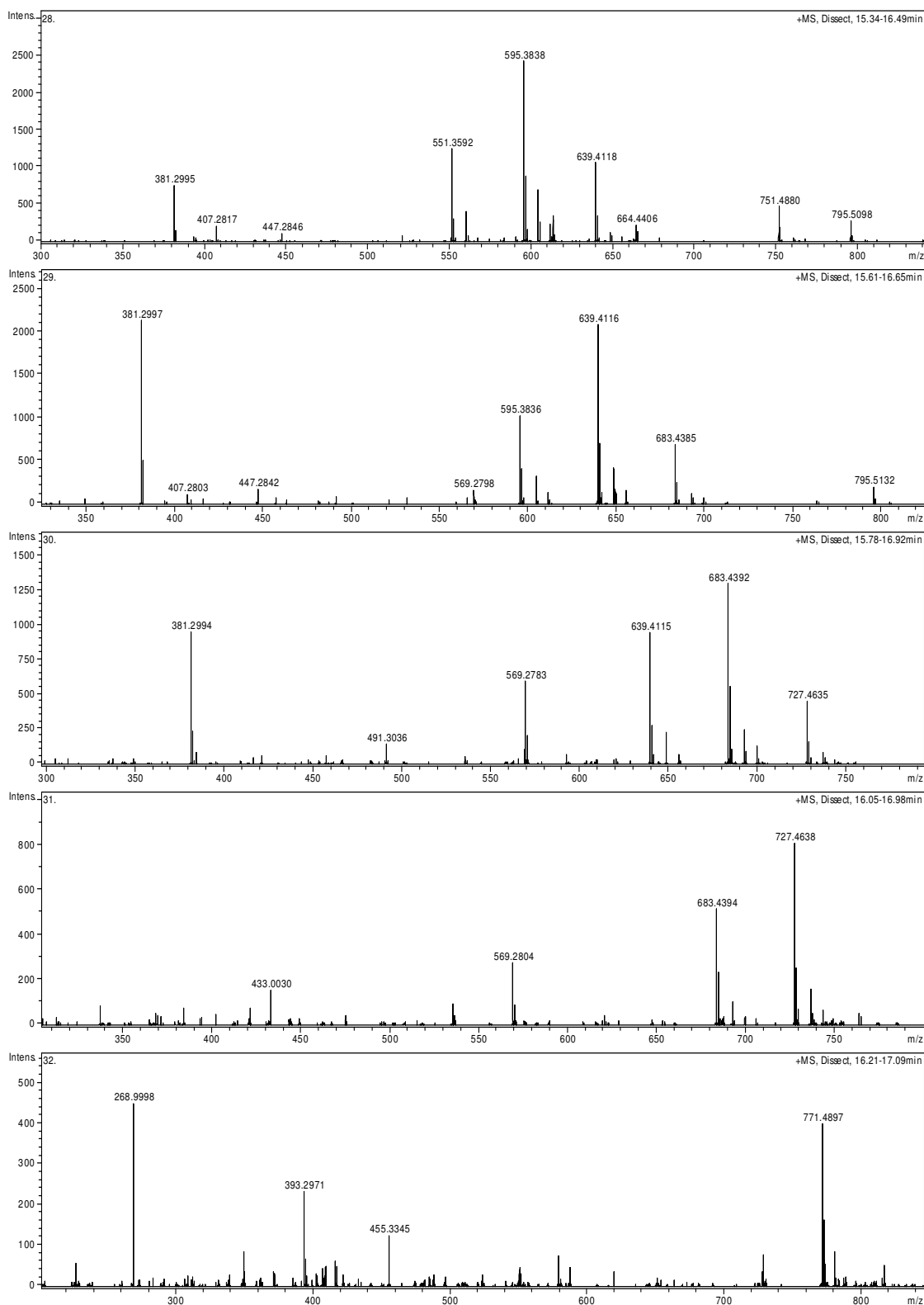
Anexo 59. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna fenil-hexil.



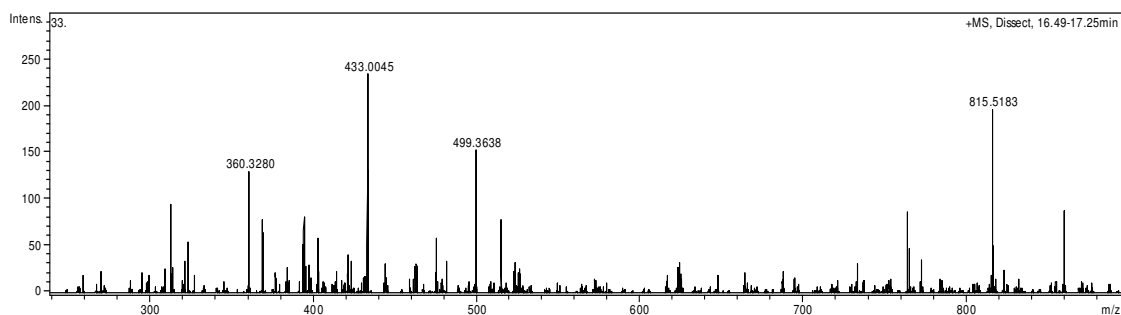
Anexo 60. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna fenil-hexil.



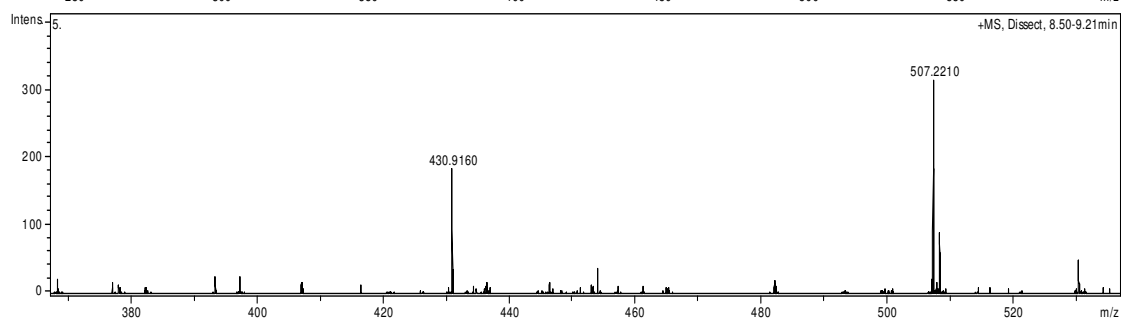
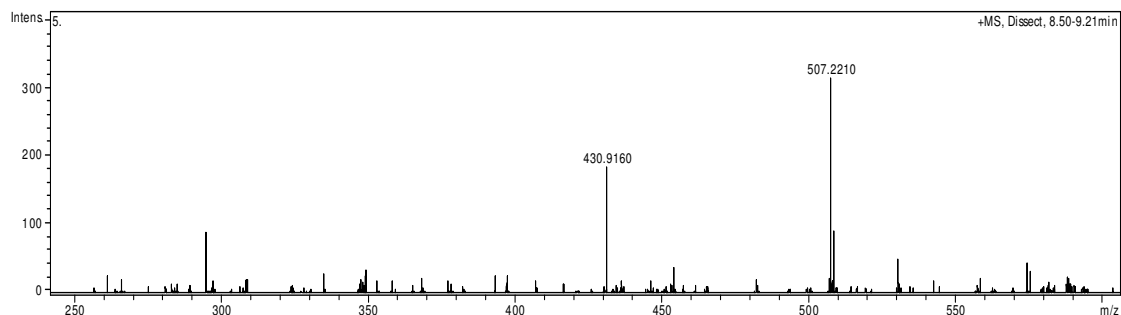
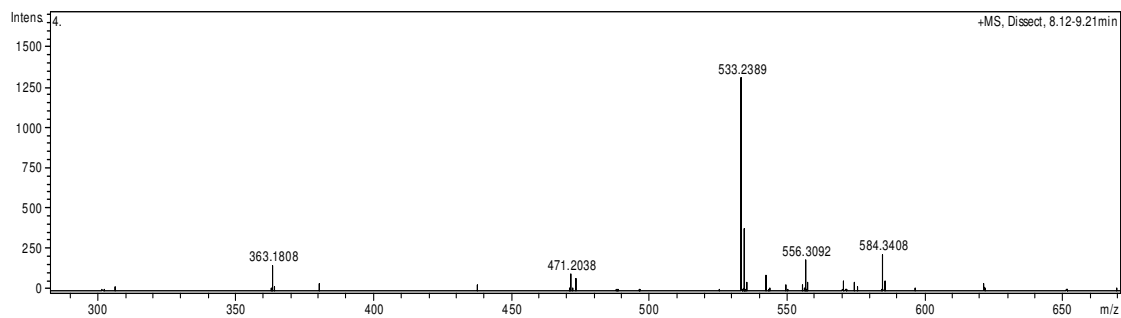
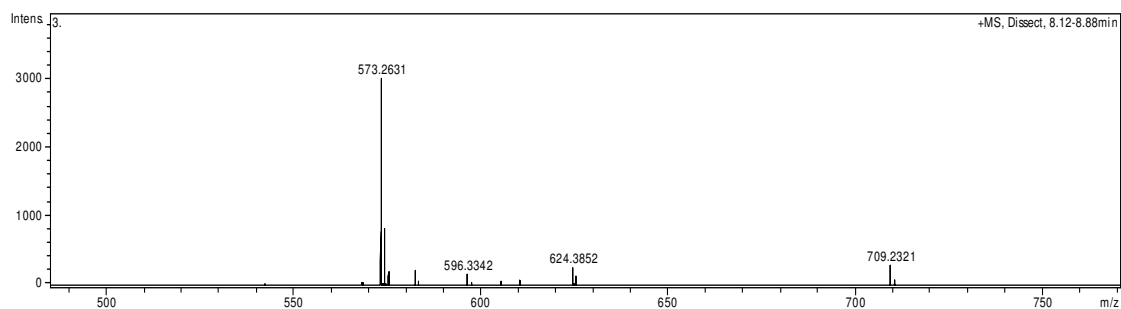
Anexo 61. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna fenil-hexil.



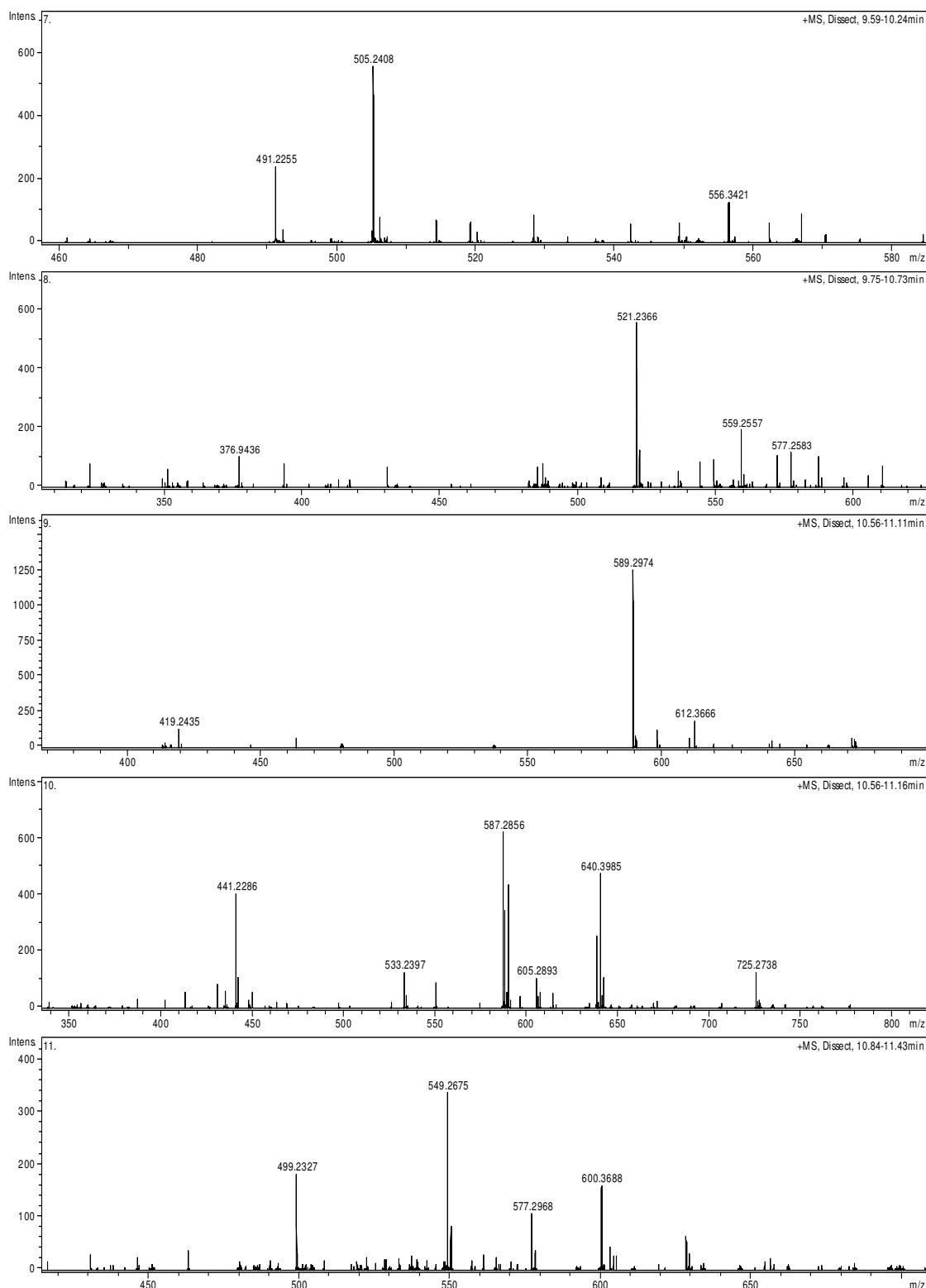
Anexo 62. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna fenil-hexil.



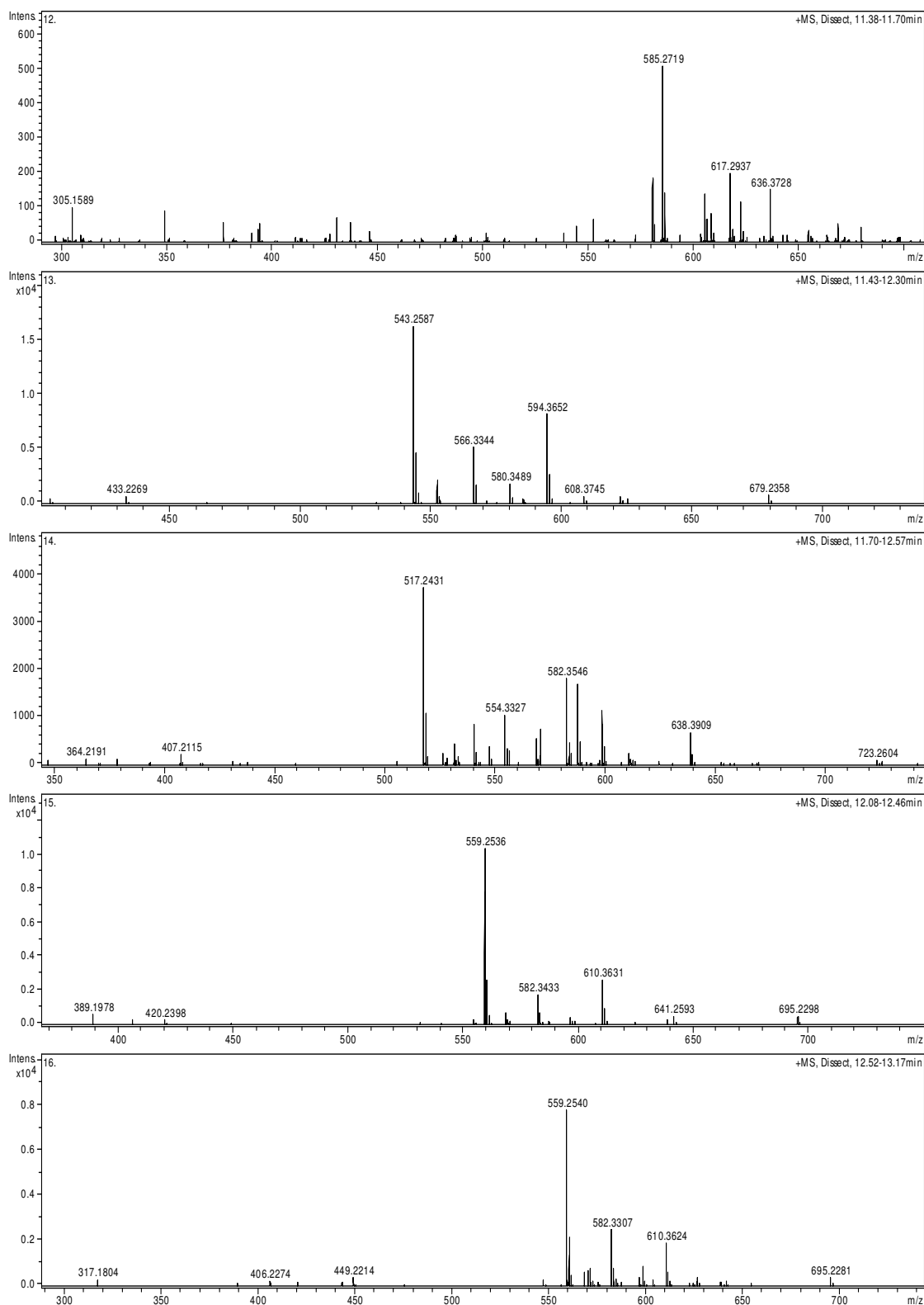
Anexo 63. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna fenil-hexil.



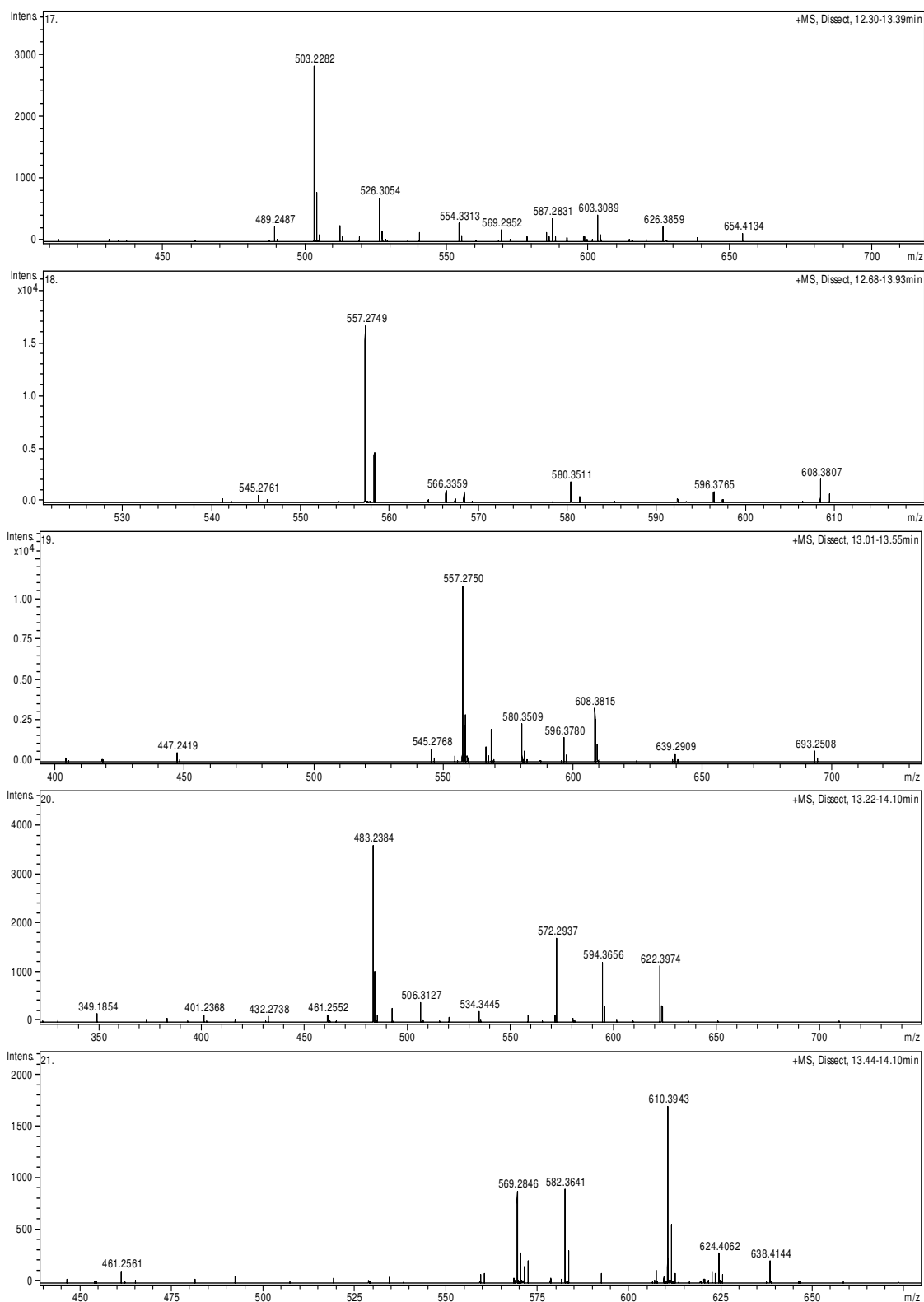
Anexo 64. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna fenil-hexil.



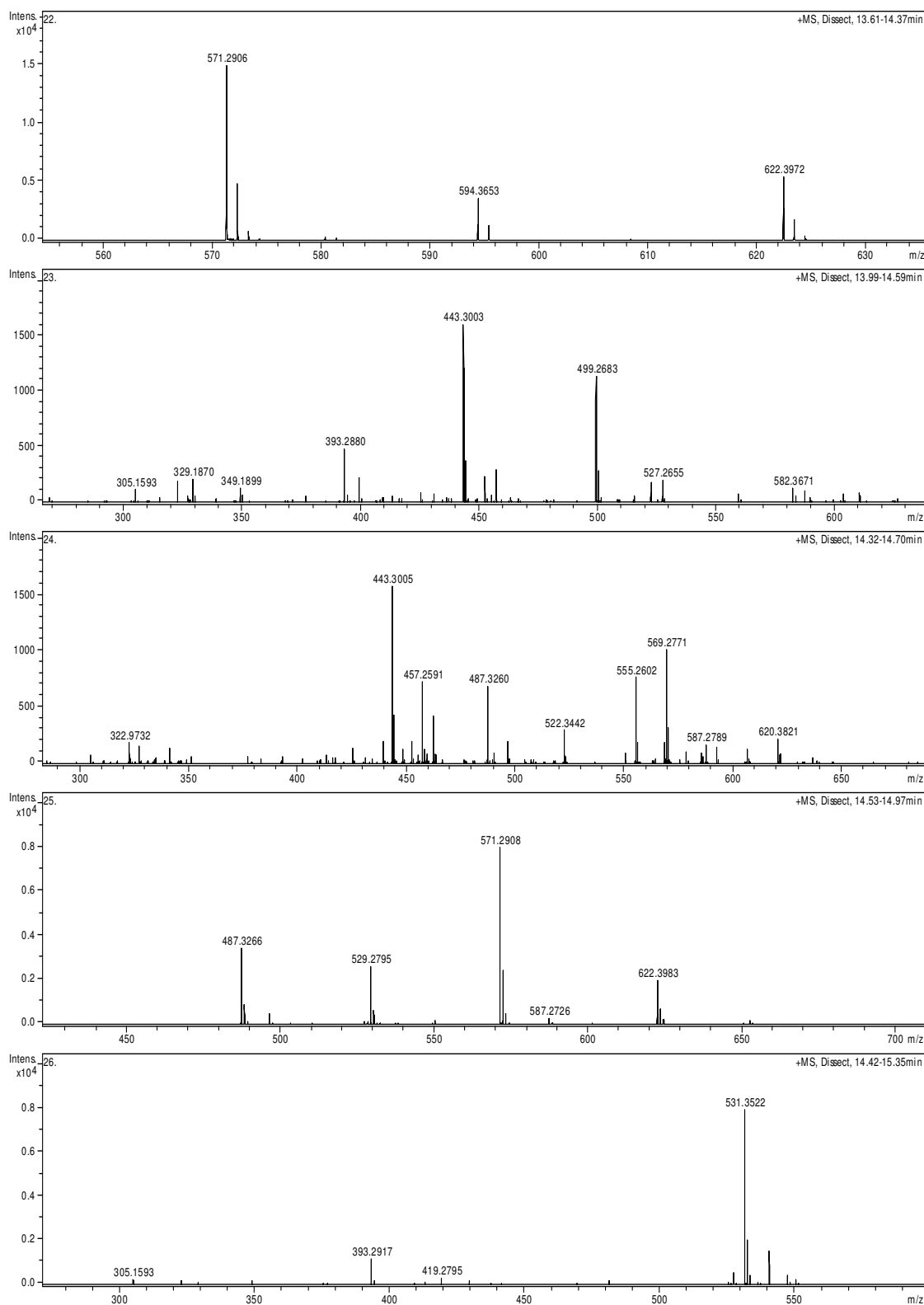
Anexo 65. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna fenil-hexil.



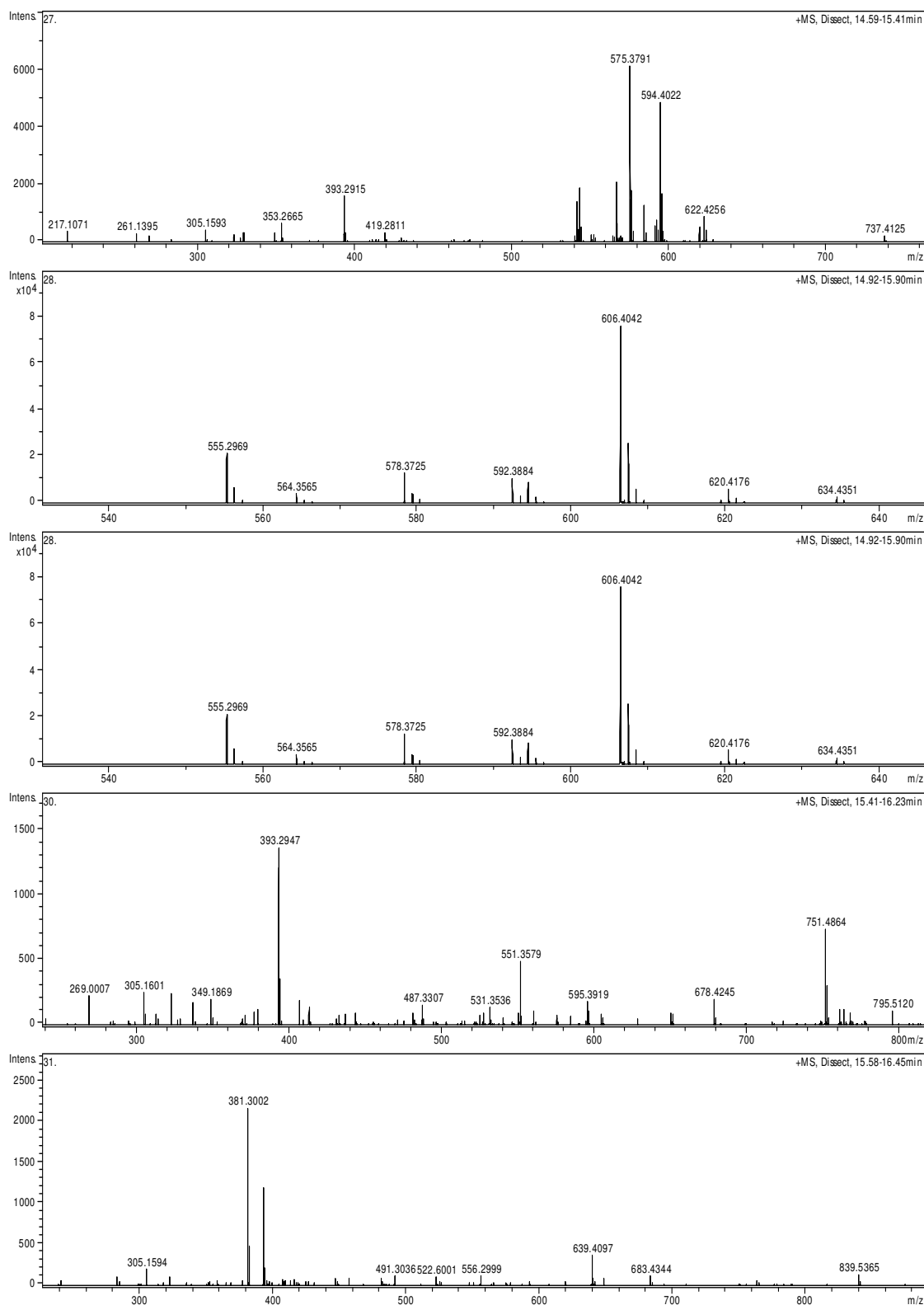
Anexo 66. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna fenil-hexil.



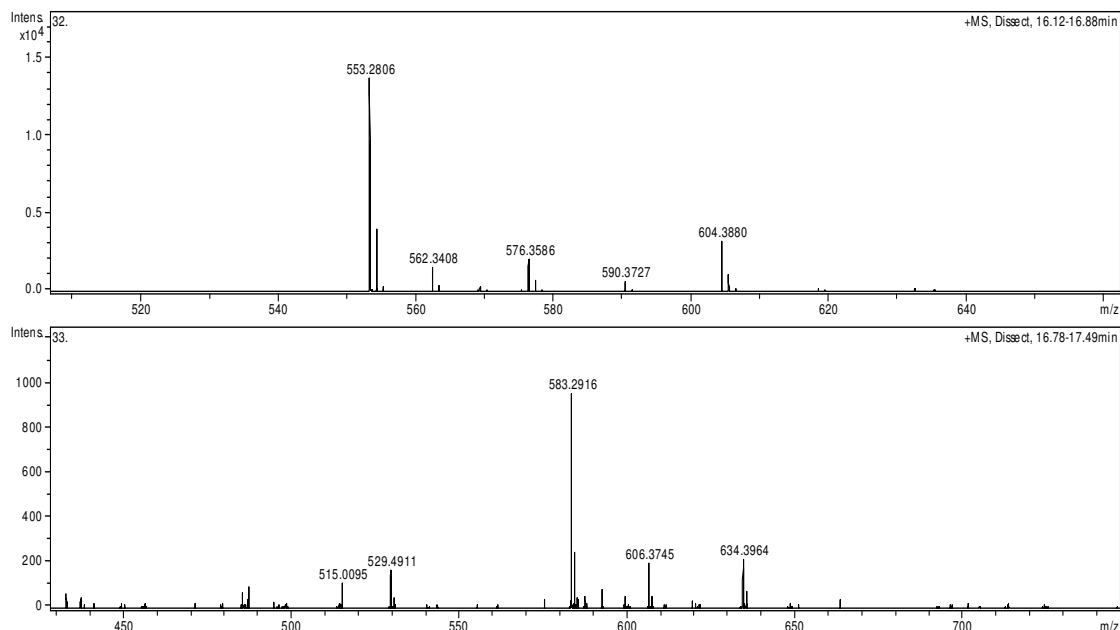
Anexo 67. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna fenil-hexil.



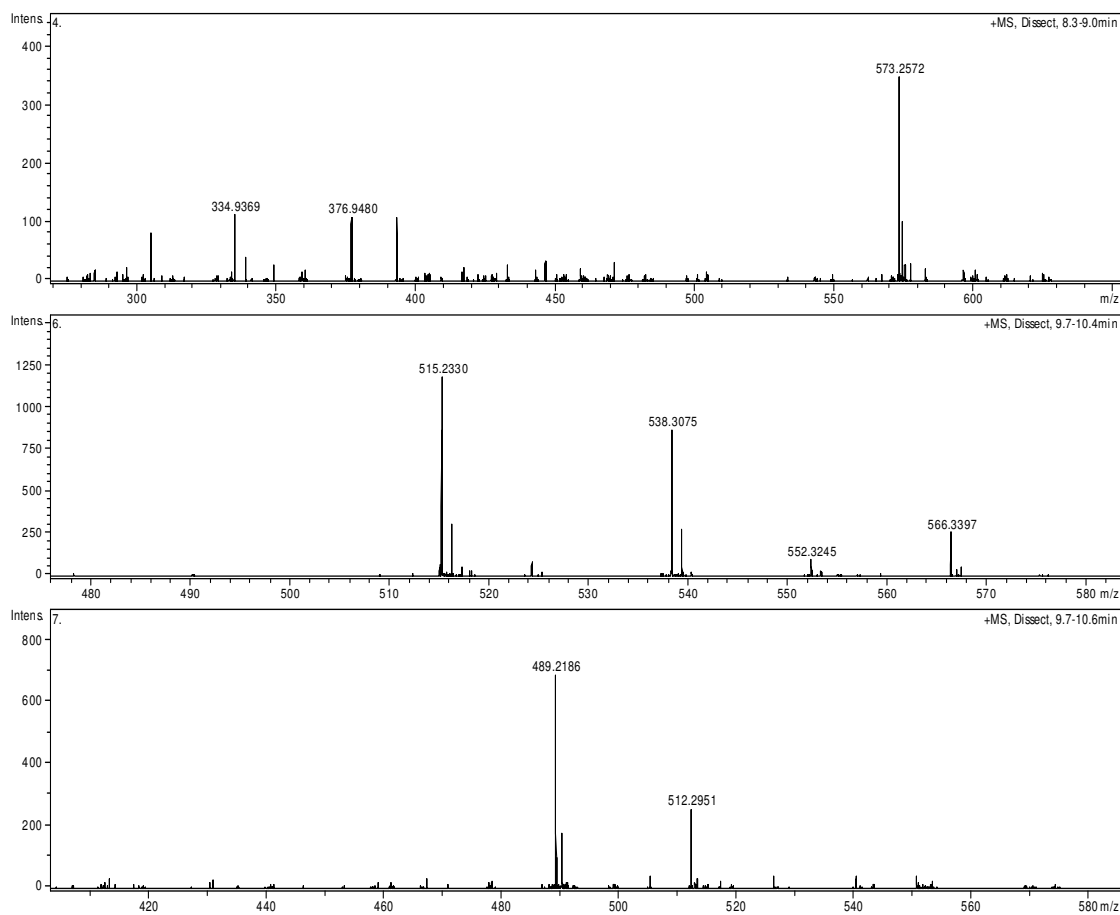
Anexo 68. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna fenil-hexil.



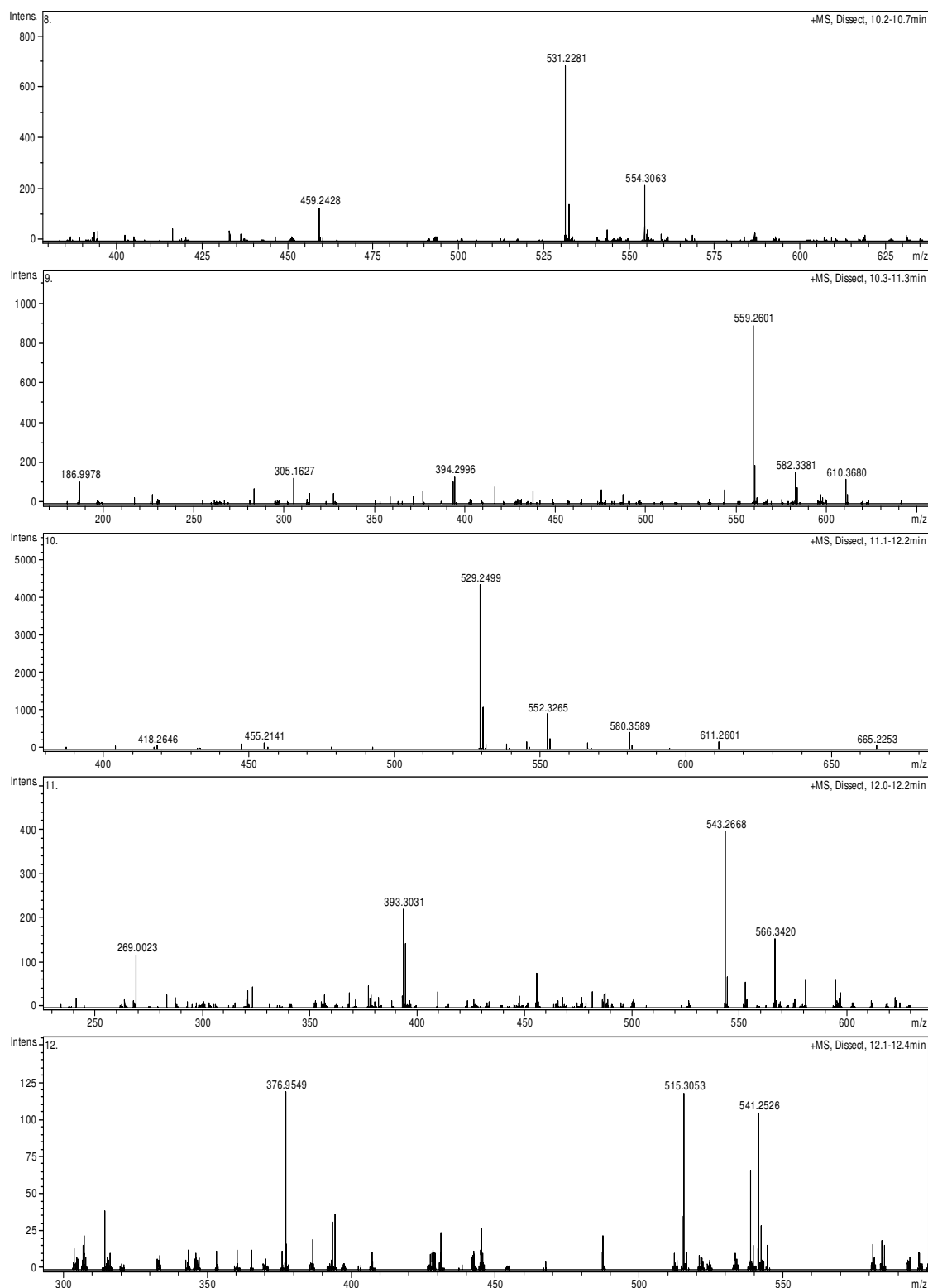
Anexo 69. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna fenil-hexil.



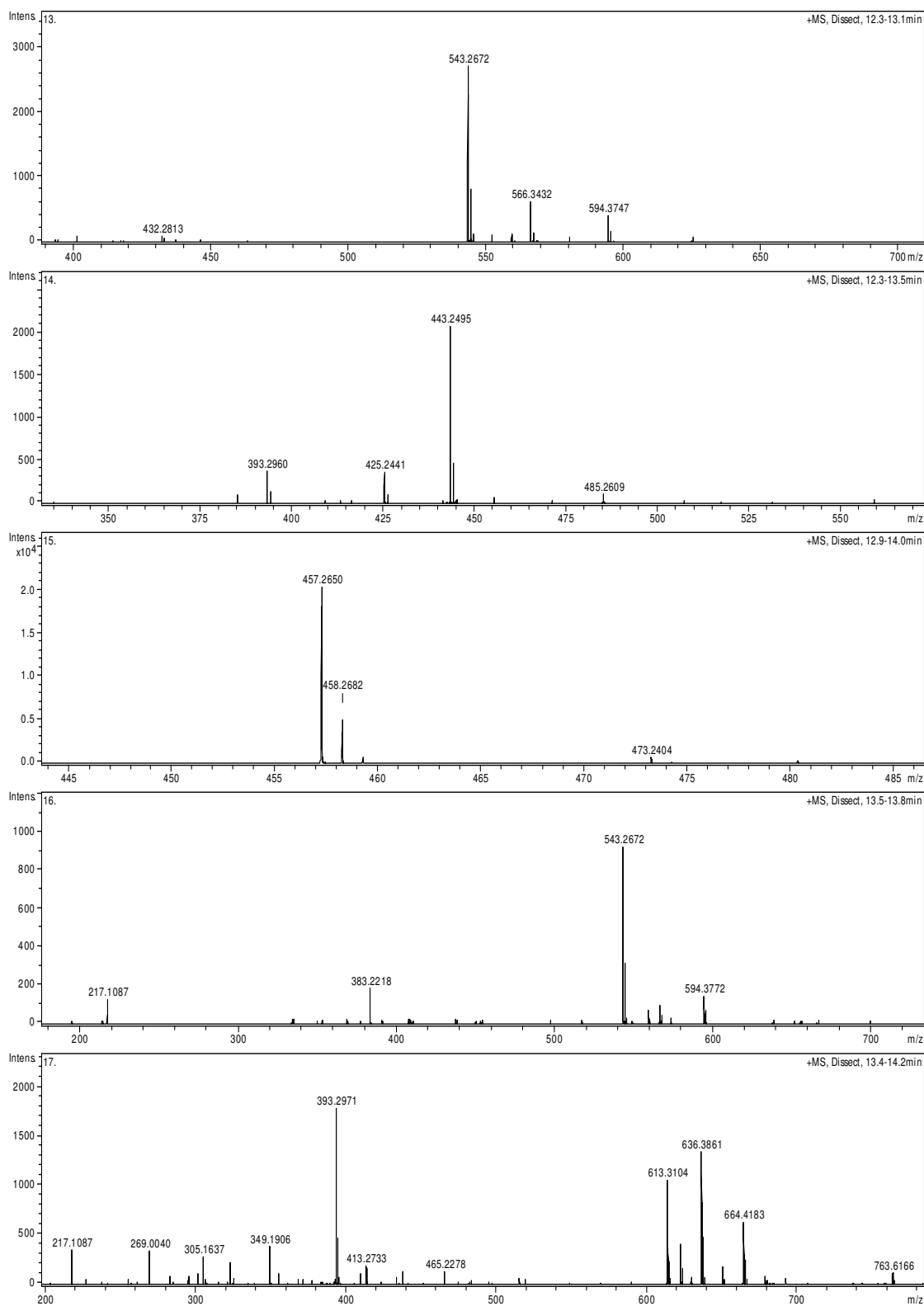
Anexo 70. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna fenil-hexil.



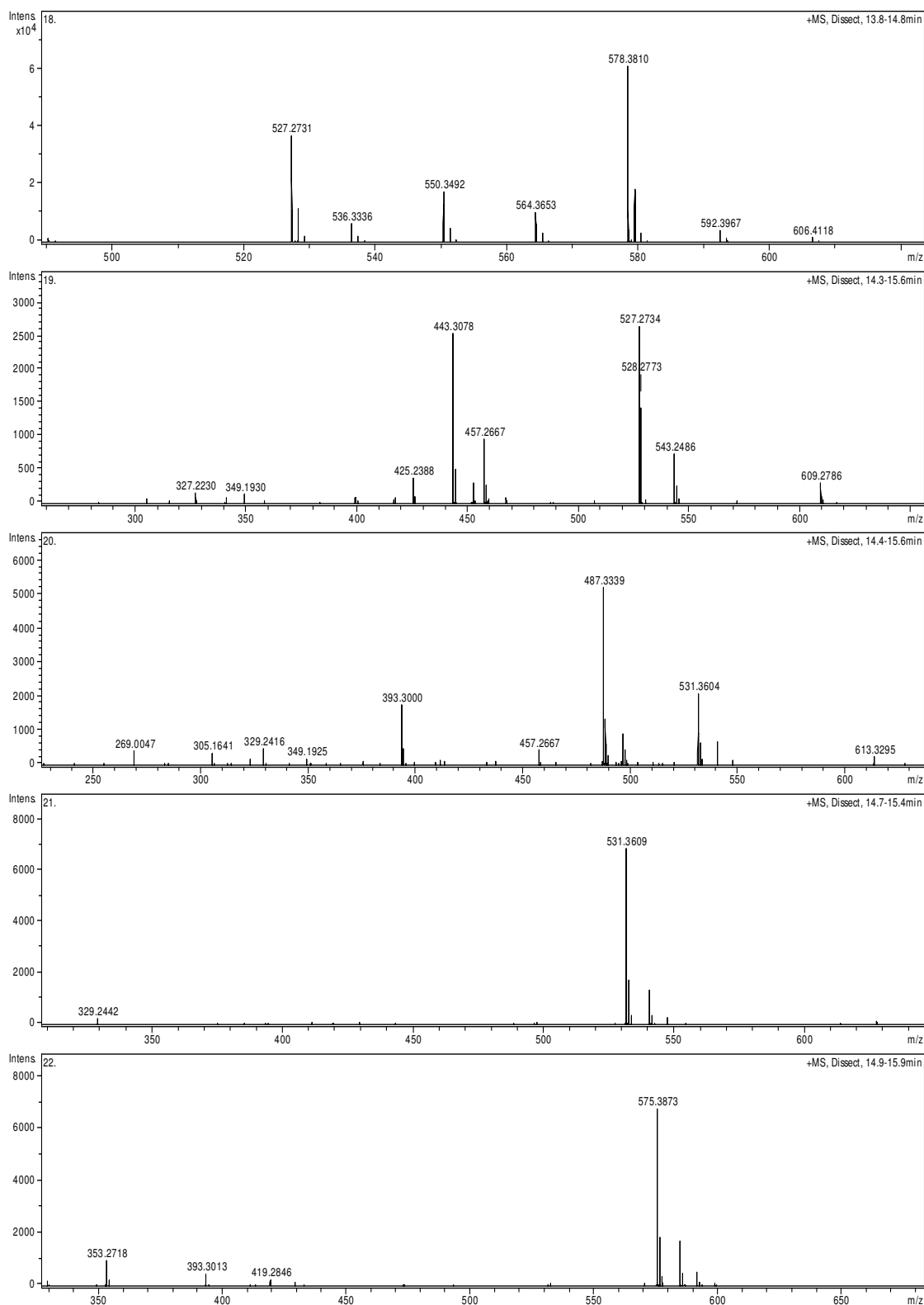
Anexo 71. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna fenil-hexil.



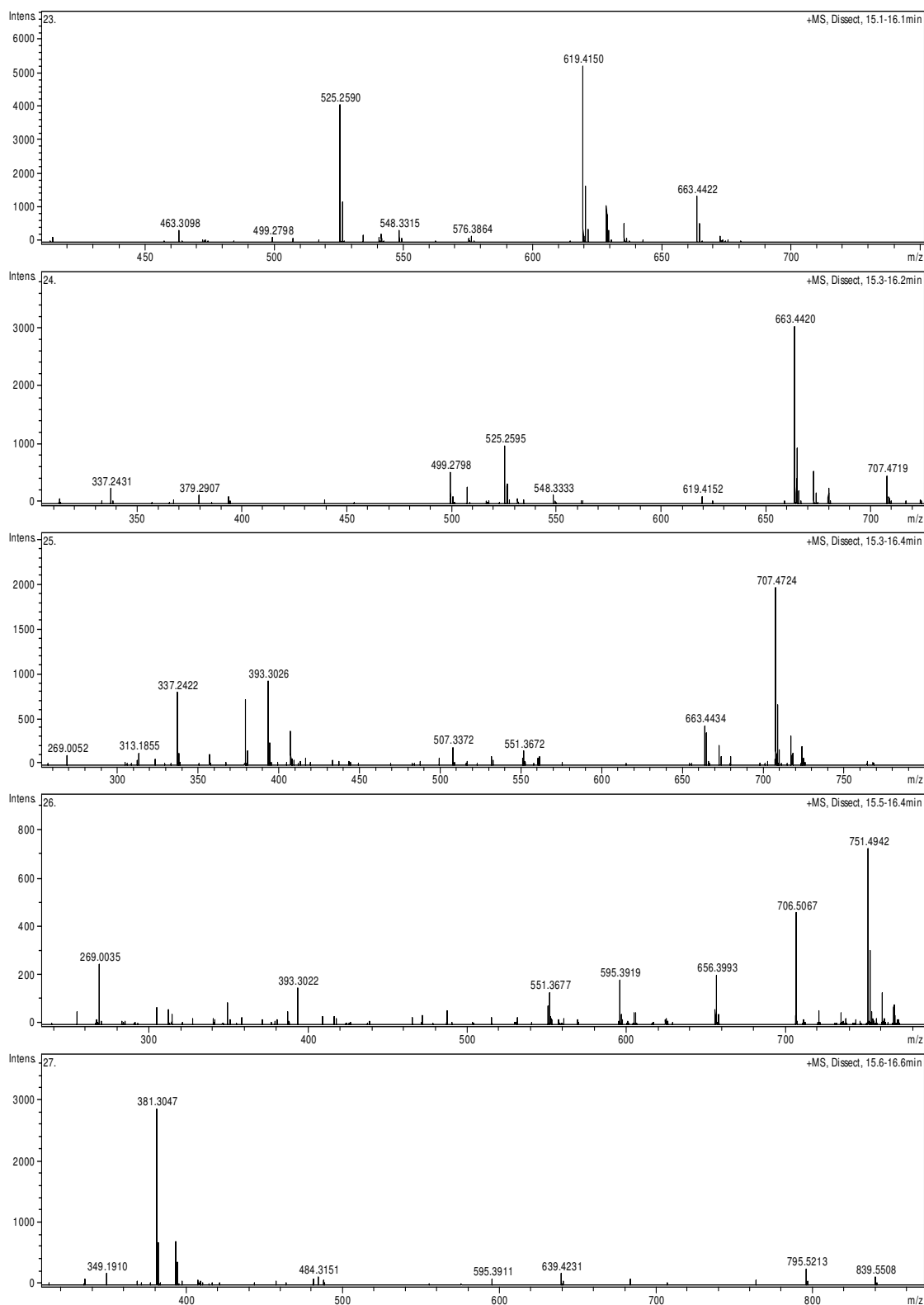
Anexo 72. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna fenil-hexil.



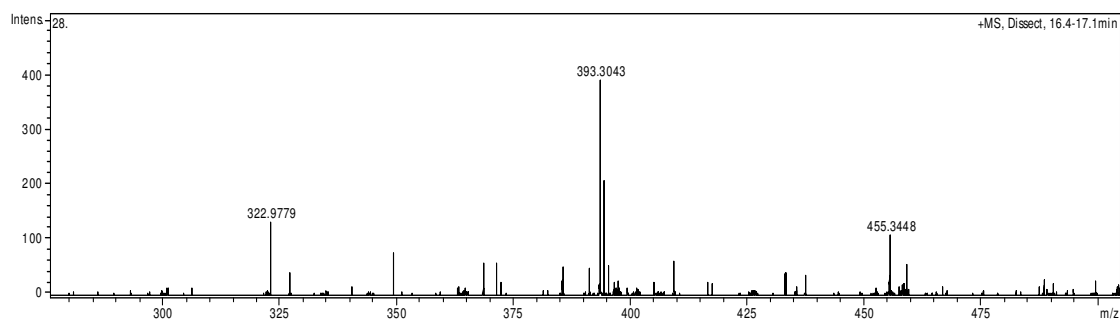
Anexo 73. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna fenil-hexil.



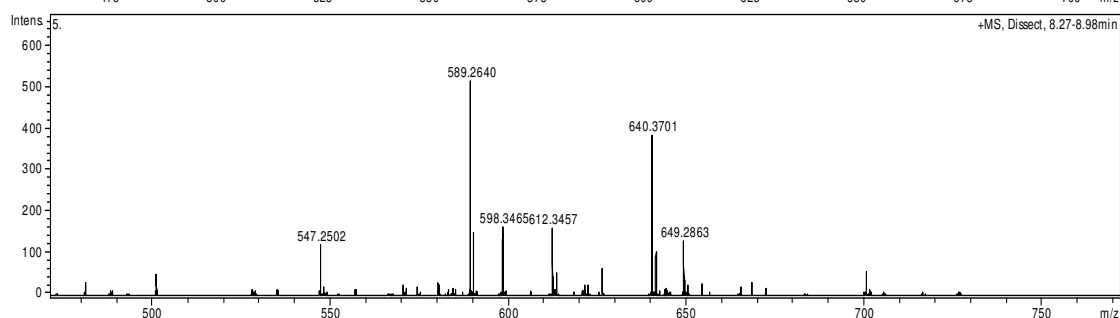
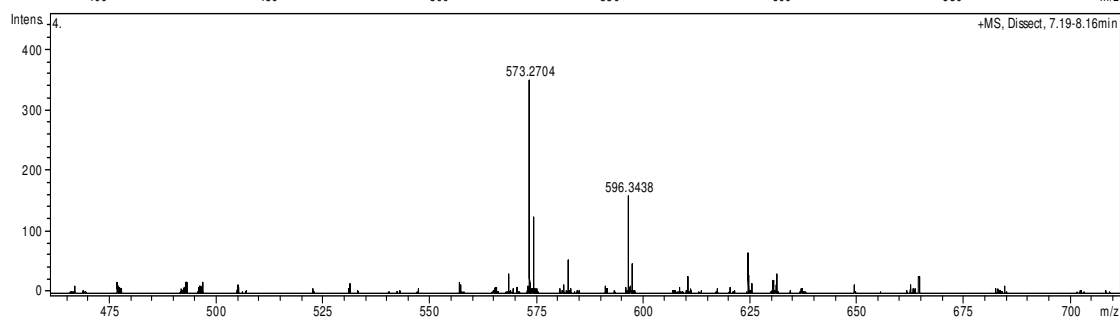
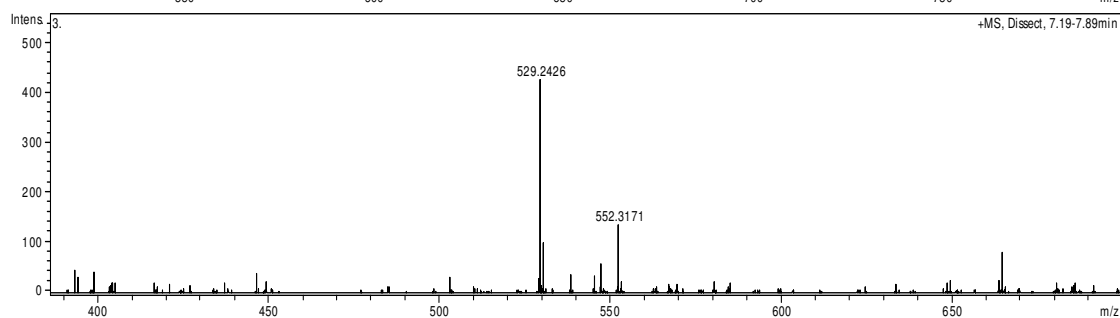
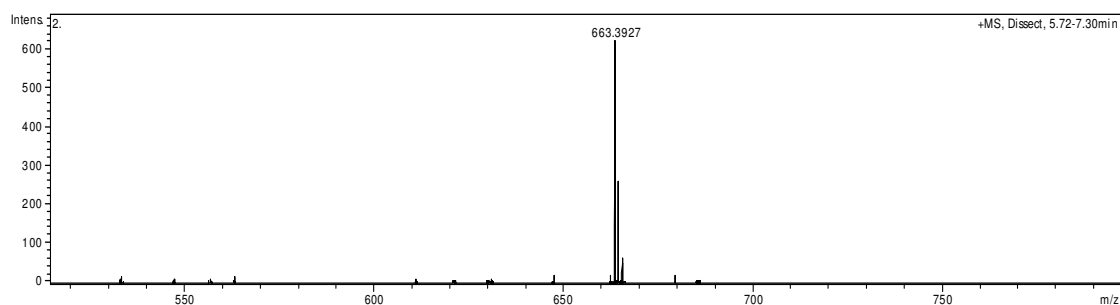
Anexo 74. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna fenil-hexil.



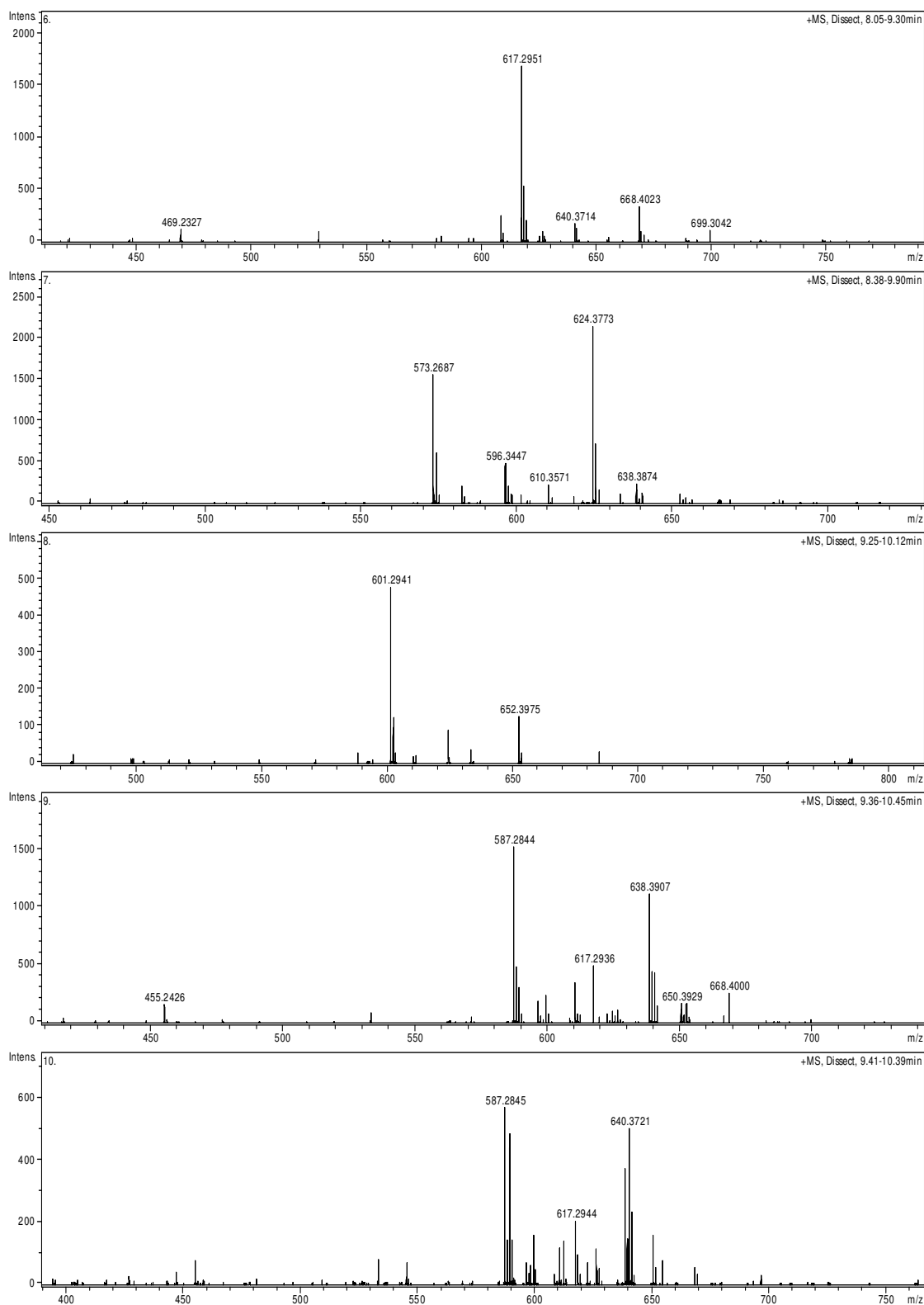
Anexo 75. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna fenil-hexil.



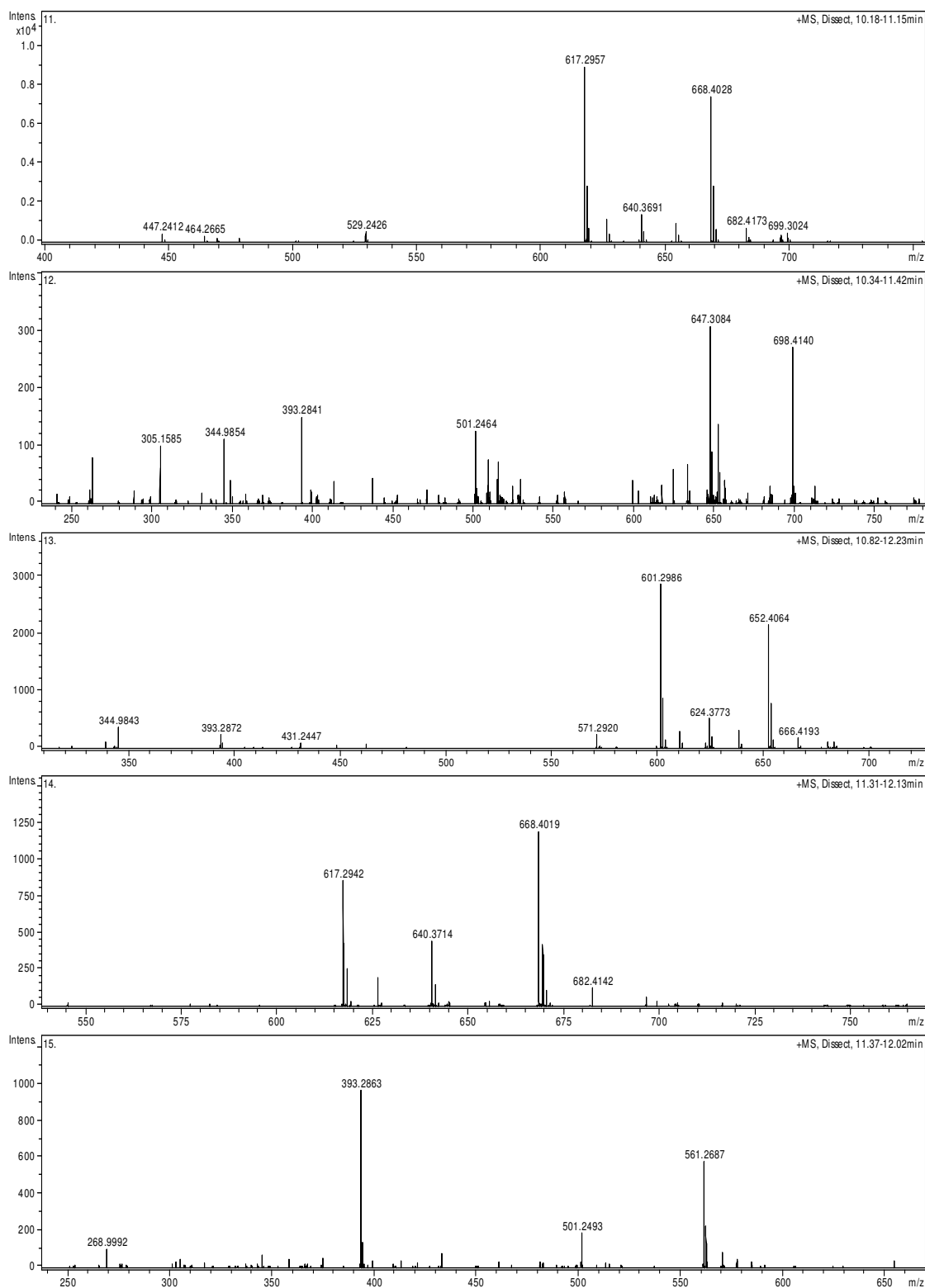
Anexo 76. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna fenil-hexil.



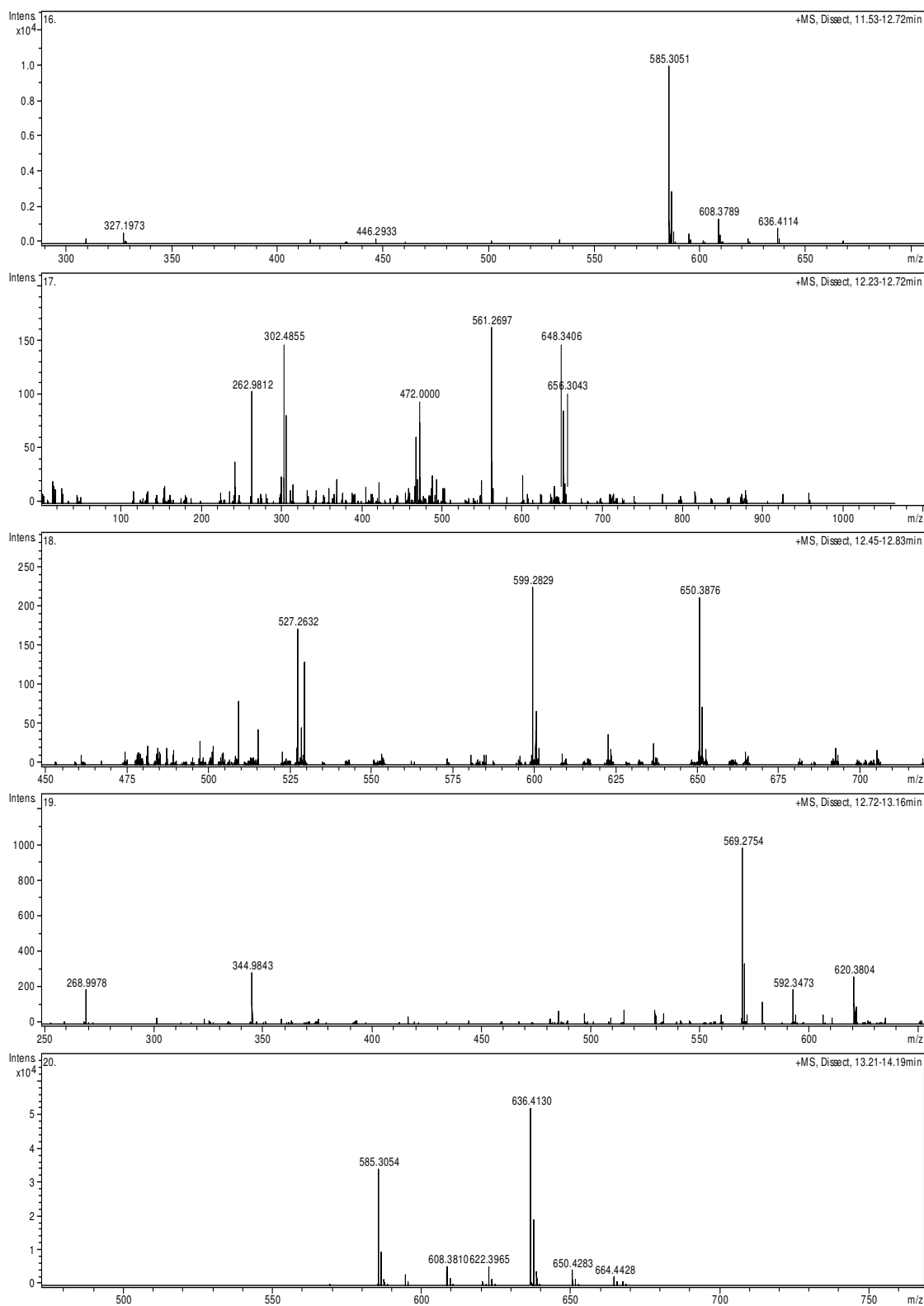
Anexo 77. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna C18.



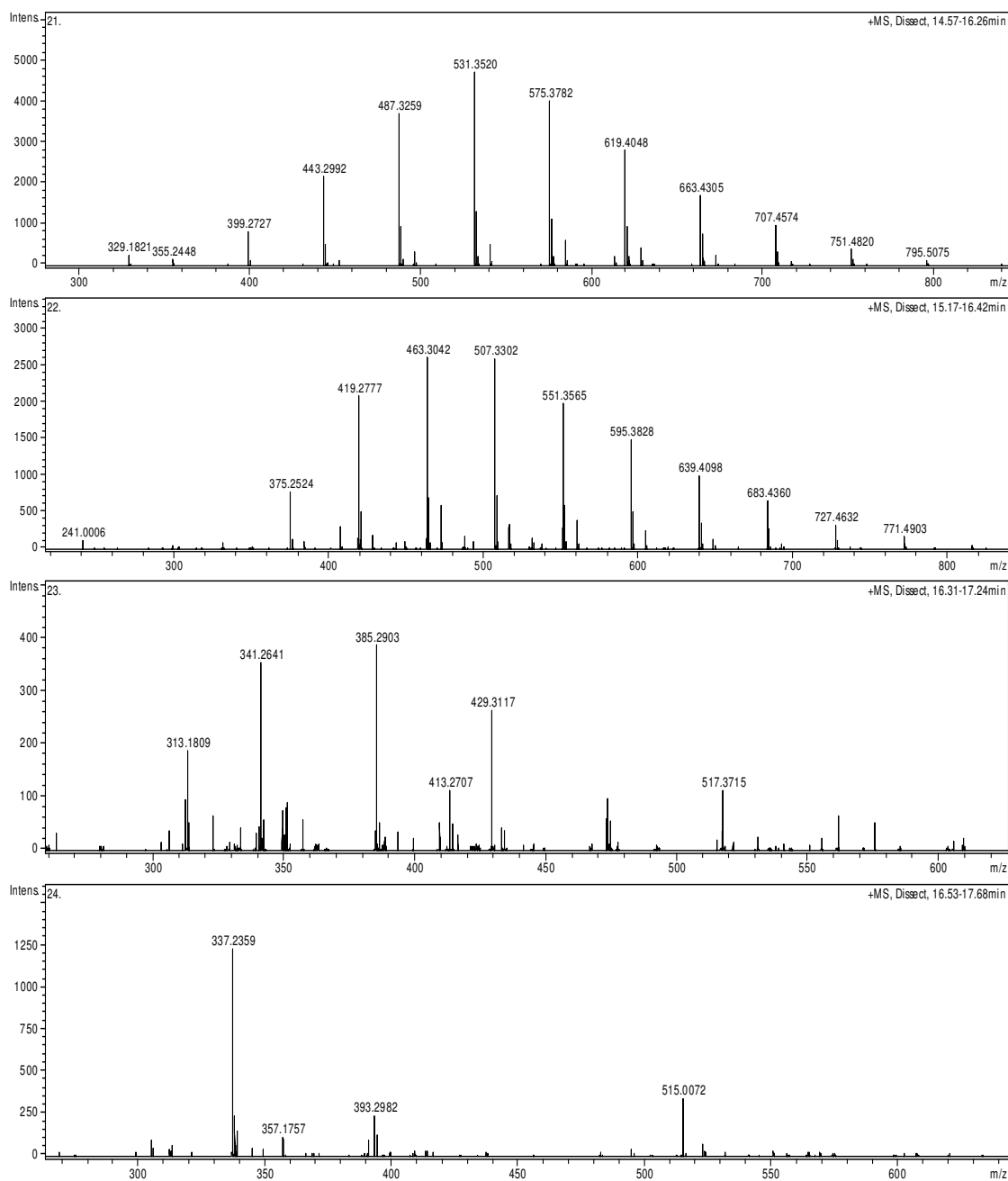
Anexo 78. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna C18.



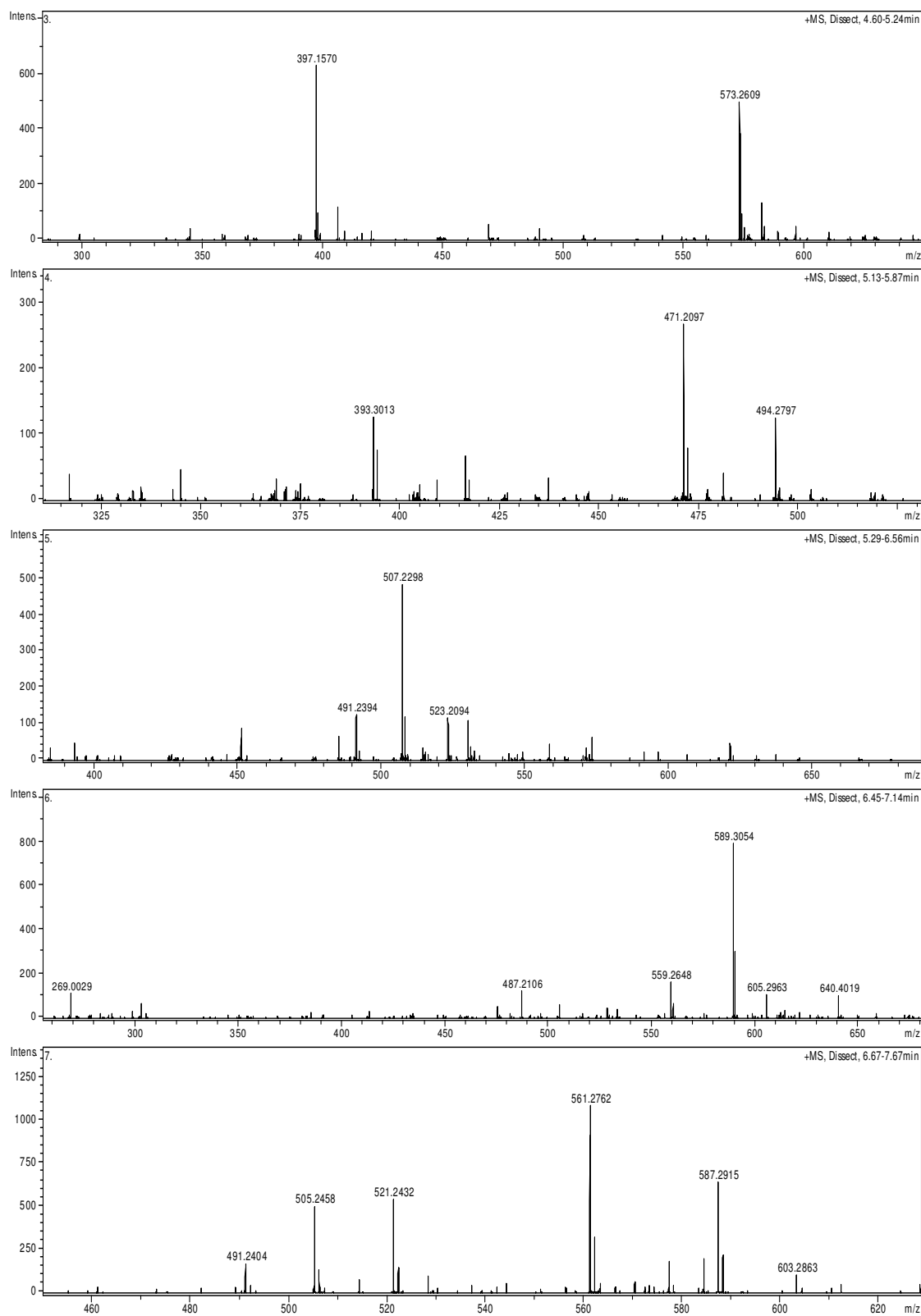
Anexo 79. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna C18.



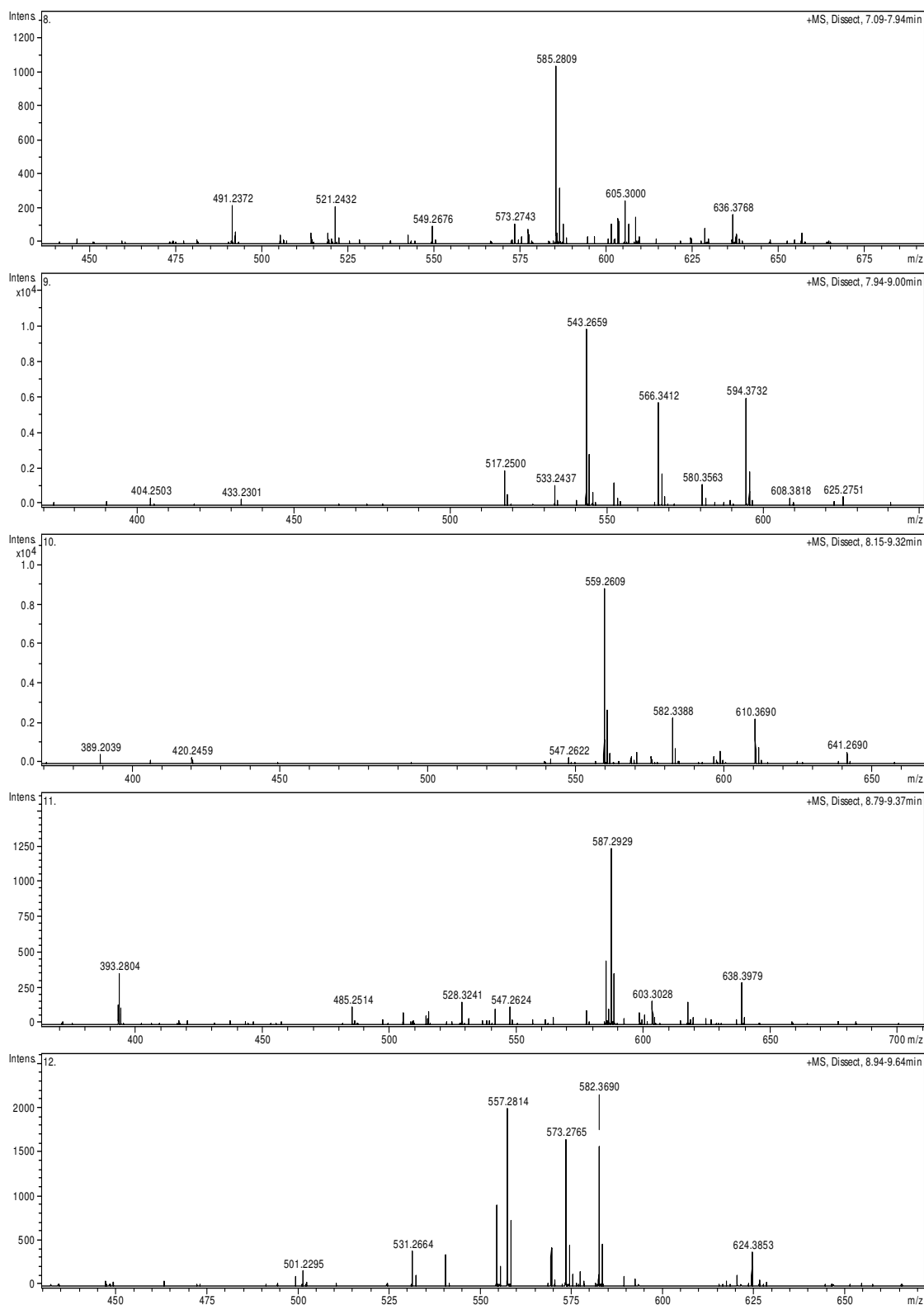
Anexo 80. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna C18.



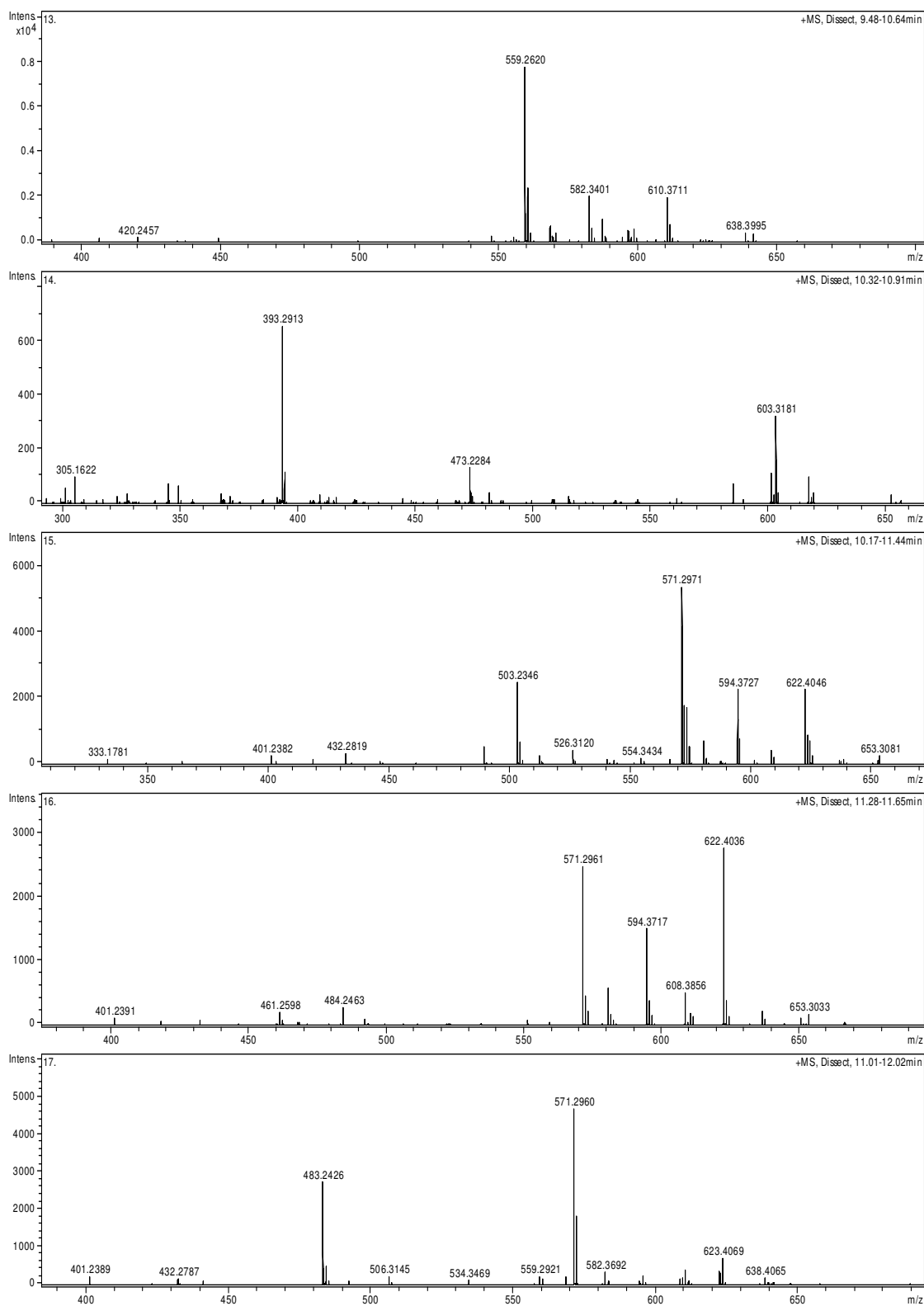
Anexo 81. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 32 obtido em coluna C18.



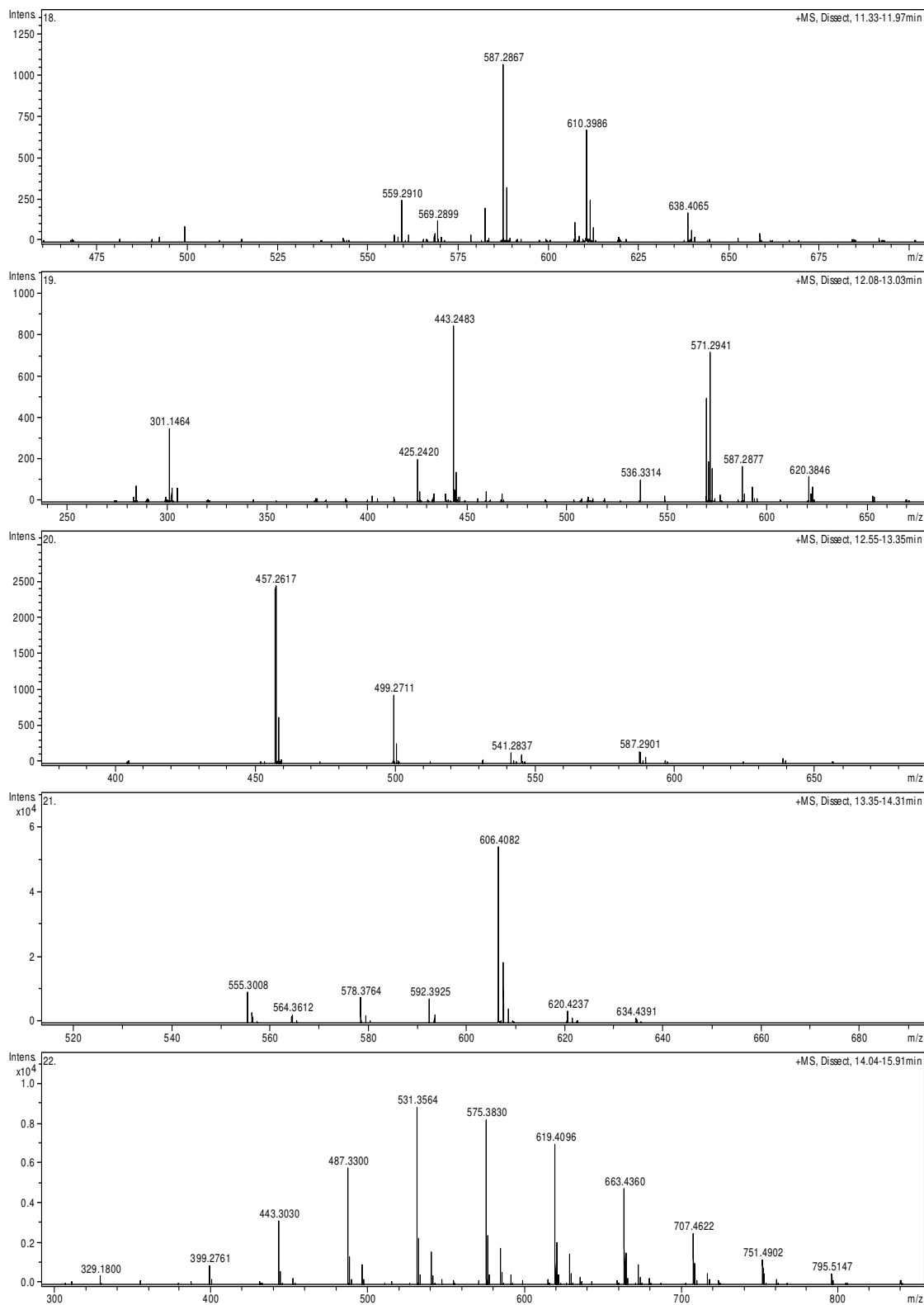
Anexo 82. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna C18.



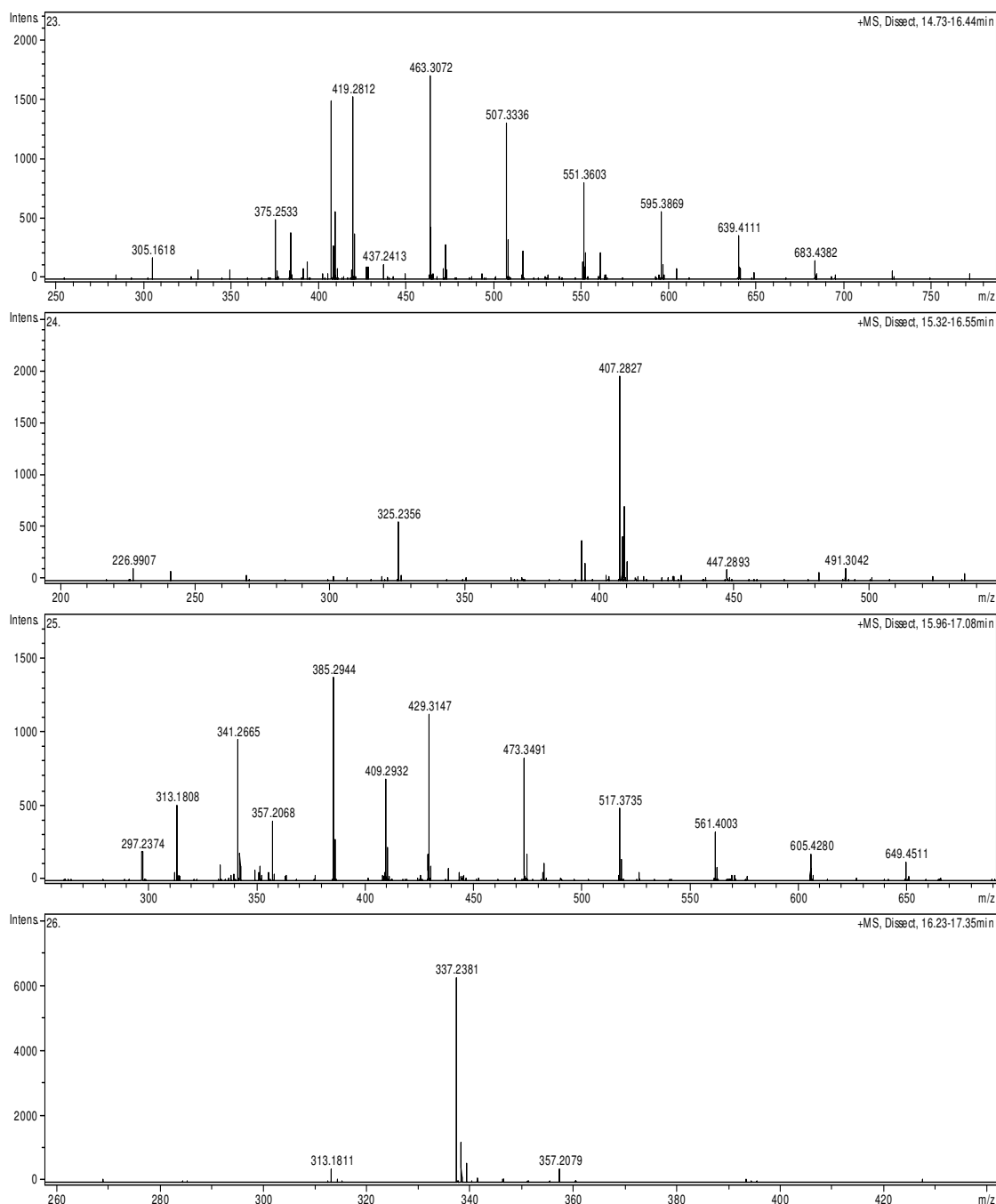
Anexo 83. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna C18.



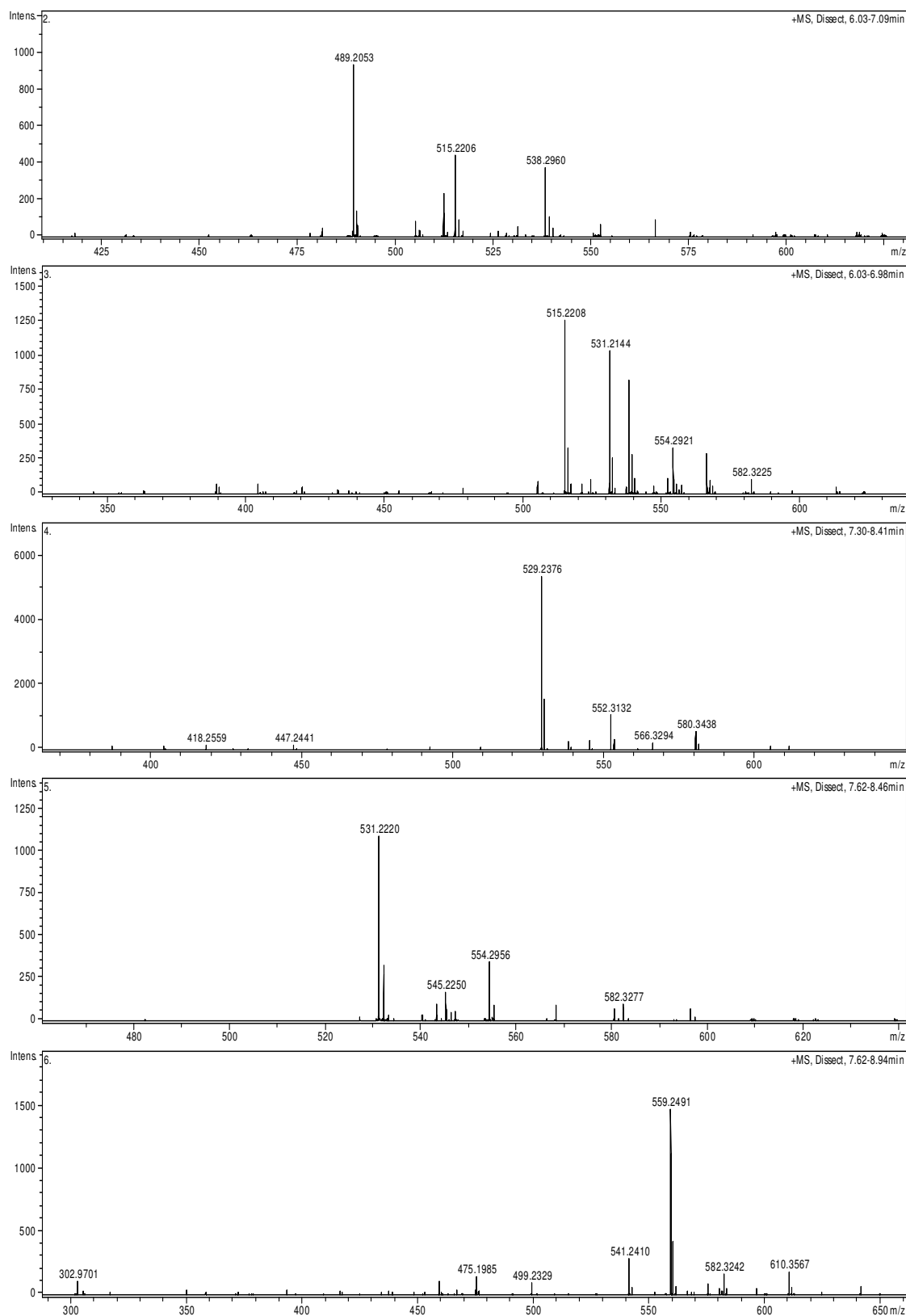
Anexo 84. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna C18.



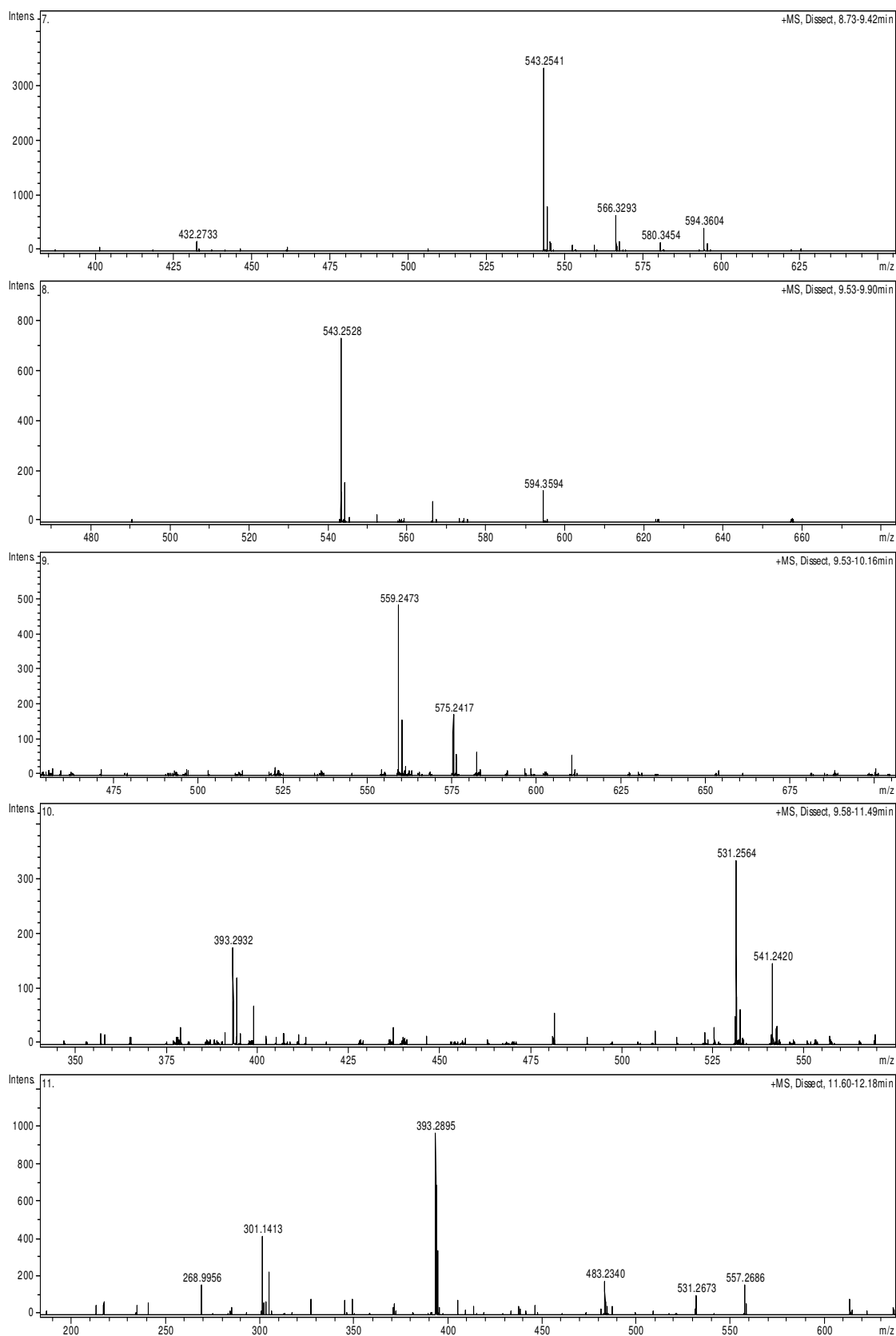
Anexo 85. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna C18.



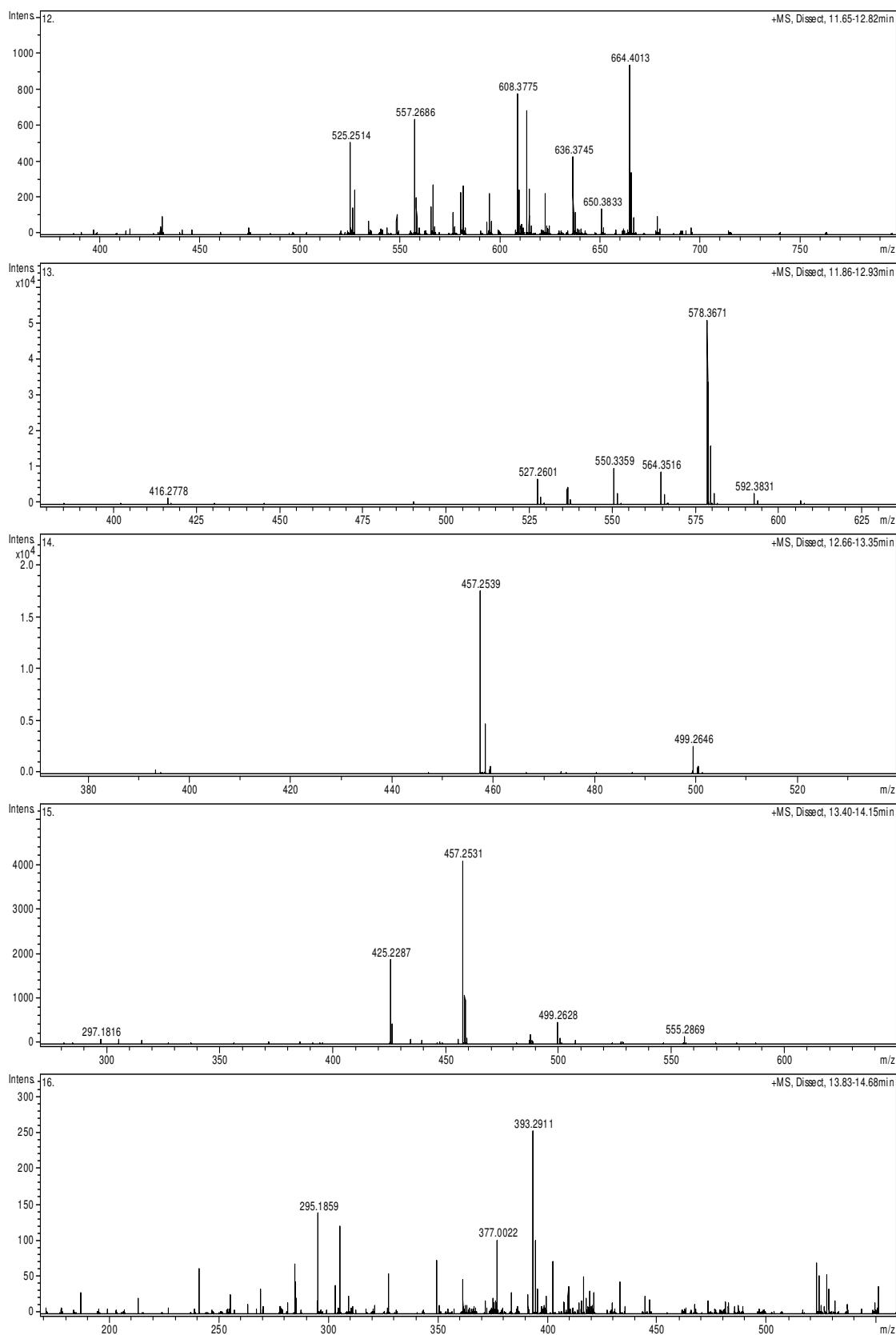
Anexo 86. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 33 obtido em coluna C18.



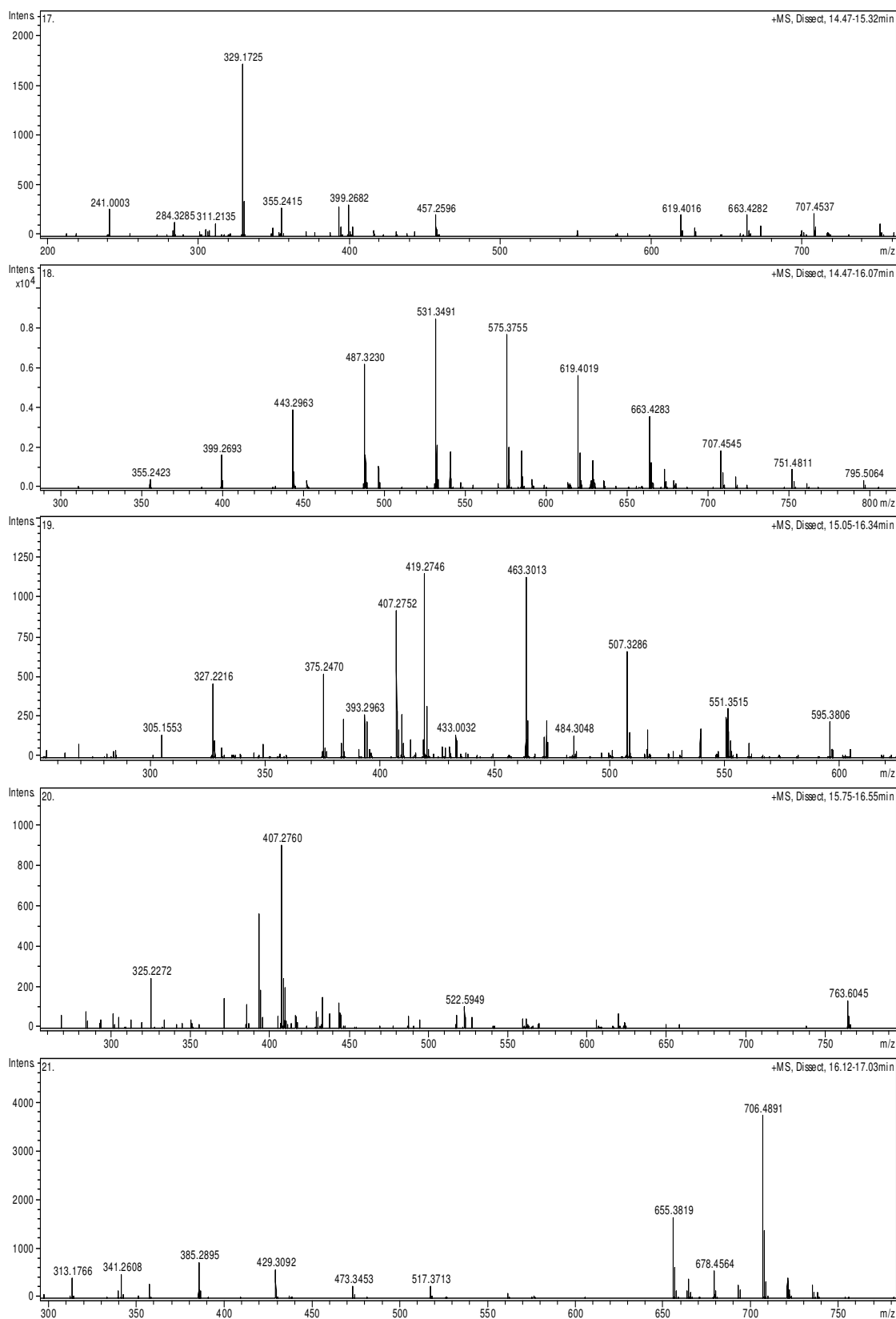
Anexo 87. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna C18.



Anexo 88. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna C18.



Anexo 89. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna C18.



Anexo 90. Espectro de massas para os picos detectados nos cromatograma da figura 34 obtido em coluna C18.