

Otimização da separação de casearinas por CLAE preparativa, através de planejamento fatorial e superfície de resposta.

Carla Cristina Perez (IC)¹, Aristeu Gomes Tininis (PG)¹, André Gonzaga dos Santos (PG)¹, Vanderlan da Silva Bolzani (PQ)¹ e Alberto José Cavalheiro* (PQ)¹.

¹NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

Instituto de Química / UNESP – Departamento de Química Orgânica - Rua Prof. Francisco Degni S/N.

CEP 14800-900 - Araraquara - SP

*e-mail: albjcava@iq.unesp.br

Palavras Chave: *Casearia sylvestris*, CLAE preparativa, casearinas.

Introdução

Casearia Sylvestris SW tem sido citada como espécie interessante do ponto de vista farmacológico por suas atividades antitumoral^{1,2}, antiúlcera³, inibidora de fosfolipases⁴, entre outras. Estudos com essa espécie vegetal indicam que as substâncias responsáveis pelas atividades citotóxica e antiulcerogênica de *C. sylvestris* são os diterpenos clerodânicos (casearinas). Uma avaliação criteriosa dos procedimentos de purificação anteriormente realizados indica que a etapa crítica da purificação de casearinas tem sido a CLAE prep, onde os rendimentos têm sido sistematicamente baixos. Buscando solucionar este problema, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo criterioso do procedimento de transferência de escala do modo CLAE analítico para CLAE preparativo, a partir de fração enriquecida em casearinas. Esse estudo foi realizado com planejamento fatorial e análise quimiométrica dos resultados.

Resultados e Discussão

A partir de uma fração enriquecida em casearinas, inicialmente foram estudadas as condições de separação em CLAE em dois modos cromatográficos: fase normal (Si) e reversa (C-18 e fenil-hexil). Após a otimização e comparação da separação em cada fase estacionária e fase móvel, foram selecionadas as colunas Phenomenex - C-18 (ACN:H₂O 64:36) e Supelco Hypersil - Si (Hex/i-PrOH 95:05) para continuidade dos experimentos devido a melhor resolução e a presença de maior número de picos observados. A seguir foram otimizados os parâmetros fluxo (F), volume máximo de injeção (V_i) e capacidade de carga da coluna (C), utilizando as colunas analíticas (250 x 4,6 mm) de fase reversa (C-18) e de fase normal (Si), através de planejamento fatorial (3³), utilizando-se 3 variáveis independentes (F, V_i e C) e uma variável dependente – resolução global (Rs_g) para dois conjuntos de respostas (C-18 e Si). Para cada conjunto de resposta foram realizados 8 experimentos. A partir das superfícies de resposta

obtidas foram determinadas as condições máximas de carga e fluxo (V_i = 135 µL, C = 0,81 mg e F = 0,7 mL.min⁻¹ para C18 e V_i = 140 µL, C = 0,84 mg e F = 1,0 mL.min⁻¹ para Si) em que a Rs_g se manteve maximizada. A otimização final da capacidade de carga das colunas, aceitando uma perda de Rs de até 10%, foi realizada através de experimento univariado (Rs x V_i).

Os resultados obtidos para coluna Si foram: V_i = 0,3 mL (8,0 mg.mL⁻¹, em Hex/CH₂Cl₂ 1:1), FM Hex/i-PrOH 95:05, F = 1,3 mL.min⁻¹. Para C-18, os experimentos levaram aos seguintes resultados: V_i = 1,1 mL (8,0 mg.mL⁻¹, em ACN/H₂O 64:36), FM ACN/H₂O 64:36, F = 1,6 mL.min⁻¹. Detecção: UV a 245 nm. Estes resultados indicaram melhor capacidade de amostra para a coluna C18.

A seguir, as condições estabelecidas para fase reversa C-18 foram utilizadas para realização de fracionamento em coluna CLAE preparativa (250 x 21,2 mm), utilizando fator de proporcionalidade igual a 21,2. Foram aplicados um total de 860 mg de amostra (10 injeções de 86 mg/10 mL), obtendo-se 9 frações. Destas, pelo menos cinco apresentaram grau de pureza adequado e sinais característicos de casearinas. Do total aplicado na coluna preparativa, foram recuperados cerca de 70 % da amostra.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam maior capacidade de carga para coluna C18, em relação à coluna de Si, para uma fração bruta de casearinas. Utilizando os parâmetros cromatográficos otimizados, foi possível aumentar o rendimento na purificação desses diterpenos clerodânicos.

Agradecimentos

À Fapesp, Capes, CNPq.

¹ Morita H.; et al. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*; **1991**, 39, 693.

² Itokawa, H.; et al. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. **1990**, 38, 3384.

³ Basile A C. et al. *Journal of ethnopharmacology* **1990**, 30, 185-97

⁴ Borges M. H. et al. *Biochemistry & molecular biology* **2000**, 127, 21-30