

UBAJARA ÍNDIO DO BRASIL VON LINSINGEN

SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPONENTES DO ÓLEO DA
CASCA DE CASTANHA DE CAJU (*Anacardium occidentale*)
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

TESE DE MESTRADO APRESENTADA AO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CURITIBA - 1983

BANCA EXAMINADORA:

DR. JOÃO BATISTA CHAVES CORREA .

DR. MARCO AURÉLIO LACOMBE FEIJÓ

DR. MARCELO IACOMINI

TRABALHO ORIENTADO PELOS PROFESSORES !

DR, RODOLFO GHILHERME BERG

DR, JOÃO BATISTA CHAVES CORREA

SUMÁRIO

	Página
1, RESUMO	I
2, ABSTRACT	II
3, INTRODUÇÃO	1
4, PARTE EXPERIMENTAL	6
PURIFICAÇÃO DE SOLVENTES	6
ÁGUA	7
ACETONITRILA	8
METANOL	9
CLOROFÓRMIO	10
DICLOROMETANO	10
TÉCNICAS EMPREGADAS	11
CENTRIFUGAÇÃO	11
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	11
CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	12
CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO	14
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	15
5, RESULTADOS E DISCUSSÃO.	17
PURIFICAÇÃO DE SOLVENTES	17
ÁGUA	18
ACETONITRILA	18

	Página
METANOL	19
CLOROFÓRMIO	19
DICLOROMETANO	19
TÉCNICAS EMPREGADAS	20
CENTRIFUGAÇÃO	20
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	20
CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	22
CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO	23
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	24
6, CONCLUSÃO.	27
7, REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
FIGURA Nº 1; H ₂ O DA REDE DE CURITIBA	29
FIGURA Nº 2; H ₂ O DEIONIZADA E DESTILADA	30
FIGURA Nº 3; H ₂ O DEIONIZADA, DESTILADA E PASSADA ATRAVÉS COLUNA LOBAR	31
FIGURA Nº 4; ACETONITRILA - Espectro de Absorção no Ultravioleta	32
FIGURA Nº 5; METANOL - Espectro de Absorção no Ul- travioleta.	33
FIGURA Nº 6; CLOROFÓRMIO - Espectros de Absorção no Ultravioleta	34
FIGURA Nº 7; DICLOROMETANO - Espectros de Absorção no Ultravioleta	35
FIGURA Nº 8; CROMATOGRAFIA EM CAMDA DELGADA	36
FIGURA Nº 9; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	37
FIGURA Nº 10; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	38
FIGURA Nº 11; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	39
FIGURA Nº 12; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	40
FIGURA Nº 13; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	41
FIGURA Nº 14; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	42
FIGURA Nº 15; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	43
FIGURA Nº 16; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	44
FIGURA Nº 17; CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO	45
FIGURA Nº 18; CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO	46

	Página
FIGURA Nº 19; CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO	47
FIGURA Nº 20; CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO	48
FIGURA Nº 21; CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO	49
FIGURA Nº 22; ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 1	50
FIGURA Nº 23; ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 2	51
FIGURA Nº 24; ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 2	52
FIGURA Nº 25; ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 3	53
FIGURA Nº 26; ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 4	54
FIGURA Nº 27; ESPECTRO DE MASSA - CARDANOL 1	55
FIGURA Nº 28; ESPECTRO DE MASSA - CARDANOL 2	56
FIGURA Nº 29; ESPECTRO DE MASSA - CARDANOL 2	57
FIGURA Nº 30; ESPECTRO DE MASSA - CARDANOL 3	58
FIGURA Nº 31; ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 2	59

RESUMO

Foi realizada a separação de componentes do óleo da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

No estudo das condições ótimas para tal separação, enfatizou-se o pré tratamento do óleo para o uso em CLAE, empregando-se, por exemplo, centrifugação e cromatografia de exclusão molecular.

Dentro de um sistema cromatográfico otimizado, foi conseguida a separação de isômeros geométricos com o nome cardol e também cardanol, tendo sido empregada a espectrometria de massas para a comprovação das hipóteses de que os picos obtidos correspondem aos isômeros acima.

Os solventes espectrométricos requisitados para CLAE foram obtidos por diversas técnicas de purificação a partir de produtos p.a. e devidamente testados por espectrometria no ultravioleta.

ABSTRACT

Several components of cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) were separated by high performance liquid chromatography (HPLC).

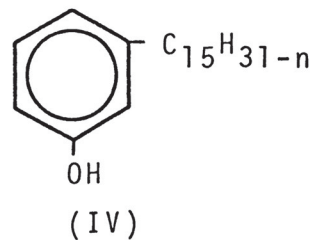
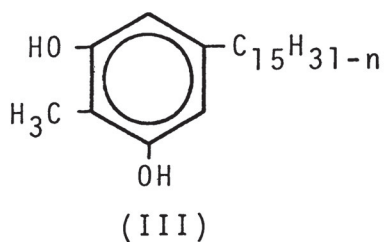
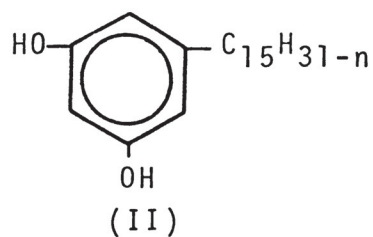
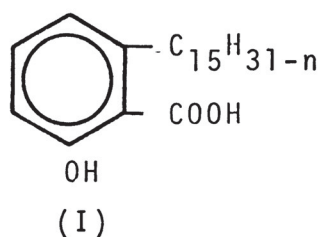
To develop the optimum conditions for those separations, sample pre-treatment was used: centrifugation and molecular exclusion chromatography.

Geometric isomers for cardol and for cardanol were successfully separated and identified by mass spectrometry.

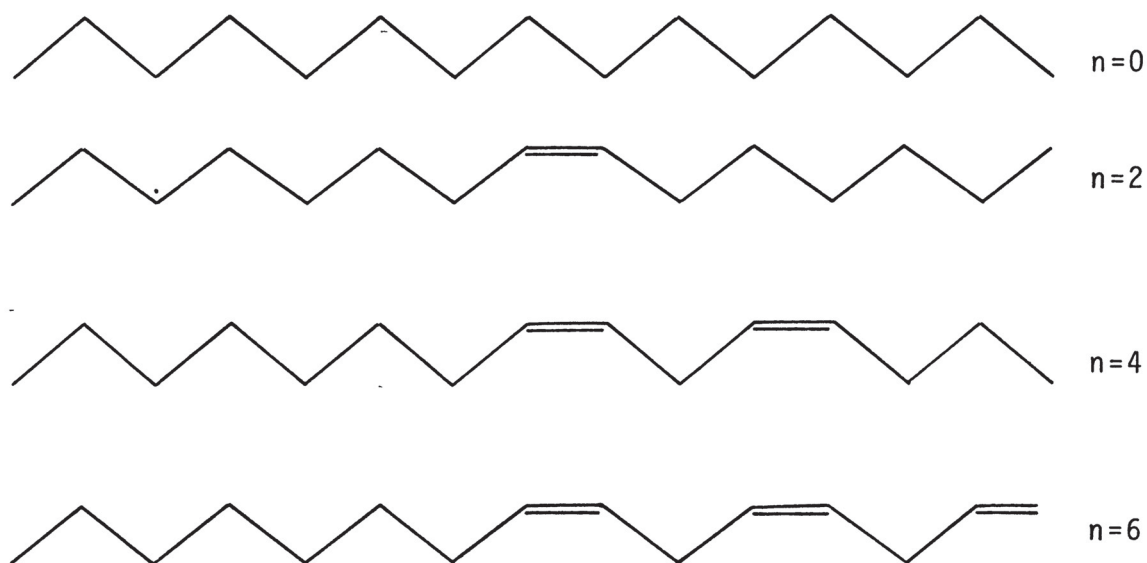
Solvents used as mobile phase were purified from reagent grade to spectrometric grade, and tested by UV-spectrometry.

INTRODUÇÃO

O óleo extraído da casca da castanha de cajú é composto, principalmente, de fenóis dotados de uma cadeia normal de 15 carbonos ligada ao anel aromático. Tais componentes são: ácido anacárdico (I), cardol (II), 2-metil cardol (III) e cardanol (IV). Existe também uma apreciável quantidade de material polimerizado.



Cada componente apresenta quatro constituintes, pois a cadeia ligada ao anel pode ser saturada, insaturada por uma, duas e até três duplas ligações.



O óleo, resultante da simples extração, é conhecido por óleo natural. Quando, por aquecimento, ocorre a descarboxilação do ácido anacárdico, recebe o nome de óleo técnico. Seus componentes isolados e também o óleo como um todo, apresentam importantes aplicações.

No campo farmacológico, por exemplo, já houve o emprego dos componentes do óleo da casca da castanha de cajú – (OCCC) como precursores de análogos de várias drogas como warfarina, fenolftaleína, saligenina, salicilanilida e salicilamida de acordo com Gulati e Subba Rao (1). Já foi relatado também o uso de substâncias como o BHC e o DDT dissolvidos no OCCC para tratamento de madeira, a qual apresentou resistência contra fungos (*P. versicolor* e *P. sanguineus*) e cupim (2). Compostos nitrogenados derivados dos constituintes fenólicos do OCCC apresentam poder bactericida, sendo ativos contra *Staphylococcus aureus* (3). Vários pesquisadores mos-

traram o uso do óleo e seus derivados na elaboração de materiais de revestimento tais como tintas, vernizes e esmaltes, nos quais surgiram características notáveis de impermeabilidade, flexibilidade, poder anticorrosivo, resistência química e térmica, rugosidade de superfície, etc. (4, 5, 6, 7, 8, 9). No Brasil, a maior aplicação do OCCC é fornecer polímeros para a indústria de lonas de freio, onde o óleo é caracterizado por métodos rudimentares como viscosidade, índice de refração, tempo de polimerização com dimetil sulfato, índice de iodo, etc.

Devido as suas inúmeras aplicações farmacológicas, bioquímicas e industriais, já tem sido feito muito no sentido de analisar qualitativa e quantitativamente o OCCC. Tyman (10), usando cromatografia gasosa, analisou tanto o óleo natural como o técnico, hidrogenando previamente o óleo, tornando então, todos os componentes saturados e transformando os fenóis em éteres metílicos; o ácido anacárdico, no caso do óleo natural, foi transformado em éster metílico. Uma determinação quantitativa (11) do óleo saturado também foi efetuada por cromatografia gasosa. Realizou-se também uma separação dos componentes do ácido anacárdico com o emprego de cromatografia em camada delgada, com nitrato de prata na fase estacionária (12). Trabalhos envolvendo CCD na análise do óleo já foram realizados (13). Também aplicou-se a espectrometria de ressonância magnética nuclear para um exame dos constituintes do OCCC (14). Tyman fez uma análise quantitativa dos principais constituintes do OCCC por CLAE, empregando fase reversa (15). Trabalhos que associavam métodos de análise foram

realizados. Tyman (16, 17) fez um estudo quantitativo dos constituintes insaturados dos componentes fenólicos do óleo por combinação de cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa e também pela associação da cromatografia em camada delgada e espectrometria de massas. Cromatografia em camada delgada, espectrometria no ultravioleta e densitometria usados conjuntamente, permitiram uma análise quantitativa do OCCC natural (18).

Dentre todas as técnicas de separação relatadas para o desdobramento dos constituintes do óleo, a CLAE parece ser a mais indicada. Trata-se de uma técnica de boa reprodutibilidade e que, por não exigir a volatilização dos componentes do OCCC, permite operação a temperatura ambiente. Isto torna viável uma análise direta do óleo, evitando transformações químicas nos componentes originais. Os outros métodos cromatográficos apresentam sérias dificuldades: na cromatografia gasosa, por exemplo, é impossível uma análise direta do OCCC. Um primeiro problema seria a descarboxilação do ácido anacárdico, a qual seguramente ocorreria na temperatura necessária para este método cromatográfico. Com efeito, trabalhos já foram realizados (10, 11) que transformam o ácido anacárdico em anacardato de metila para uso em cromatografia gasosa. Outro inconveniente é o fato dos componentes fenólicos do óleo não serem suficientemente voláteis, onde surge a necessidade de serem convertidos em certos derivados, como por exemplo, éteres metílicos (10, 16). Tais modificações químicas, mesmo conduzidas rigorosamente, podem acarretar perdas nos componentes fenólicos originais. Resoluções incomple

tas também podem acontecer. Tal dificuldade foi descrita por Tyman (16) que relata uma ligeira sobreposição entre os picos dos constituintes saturados e insaturados. A cromatografia em camada delgada, por envolver várias etapas, prejudica a pre ci s ã o exigida num trabalho quantitativo e a sua reprodutibilidade não é boa. Assim, na recuperação dos componentes já s e p a r a d o s na placa, alguma perda é verificada.

O presente trabalho pretendeu otimizar a separação dos constituintes do OCCC por CLAE.

PARTE EXPERIMENTAL

PURIFICAÇÃO DE SOLVENTES

Os seguintes procedimentos gerais foram adotados na purificação dos diversos solventes:

a) Todos os frascos onde eram recolhidos os solventes purificados e os demais envolvidos nos processos de purificação foram lavados com um preparado especial para utensílios de laboratório denominado EXTRAN LÍQUIDO (MERCK), sendo deixados mergulhados em uma solução deste material por uma noite. Depois de lavados várias vezes com água deionizada, eram secados em estufa.

b) A última etapa do processo de purificação de solventes sempre consistiu de uma filtração em um sistema Millipore, visando a retirada de partículas e a proteção do cromatógrafo a líquido.

c) Os espectros no ultravioleta foram obtidos empregando-se um espectrofotometro Beckman, modelo DB-G e células de 1 cm adotando ar como referência. A varredura foi de 320 a 200 nm. Os frascos contendo os solventes eram rotulados com seu respectivo espectro.

d) Os materiais de vidro empregados na montagem dos

aparelhos de refluxo e destilação eram de marca Kontes Quimex ou Vidrolex com conexões 24/40. A coluna tipo Vigreux apresentava 13 pratos e 50 cm de comprimento. As várias mantas de aquecimento usadas eram da marca Eletrotermal e os aparelhos de ionização da água Permutation.

ÁGUA

A água da rede da cidade de Curitiba foi deionizada e destilada. A seguir foi percolada através de uma coluna (19) com fase reversa e para trabalhar a baixa pressão: L0-BAR (Merck), tamanho B (D.I. 25 mm e comprimento 31 cm) preenchida com LiChroprep RP-8 (40-63 μ). Usando uma pressão de vida a diferença de altura de 3 metros, obteve-se uma vazão de 40 ml/hora. 0,1 % de metanol espectrométrico eram acrescentados à água assim obtida.

A cada 4 litros de água obtidos recuperava-se a coluna, tal como segue: passava-se através da coluna 100 ml de acetonitrila para espectrometria, seguidos de 200 ml de uma mistura de acetonitrila/água 1:1 e ainda 300 ml de água, quantidade suficiente para que não mais se detectasse acetonitrila.

Com o objetivo de testar a pureza da água obtida como descrito acima, procedeu-se assim: durante 15 minutos, com uma vazão de 2 ml/min, 30 ml de água atravessaram uma coluna de alta pressão com fase reversa RP-8 (LiChrosorb - 10 μ m, D.I. = 4,6 mm, L = 25 cm), onde as impurezas ficam concentradas no topo da coluna. Usando um gradiente linear de 100% de água e 0% de metanol a 0% de água e 100% de metanol tais im-

purezas foram eluídas em 10 minutos. As figuras nº 1, 2 e 3 mostram os cromatogramas obtidos com este procedimento para as seguintes amostras de água, respectivamente: água da rede da cidade de Curitiba, água deionizada seguida de destilação e água purificada na operação descrita acima com a coluna Lobar. As condições de operações estão impressas no cromatograma.

ACETONITRILA

Entre outros métodos testados, este processo de purificação (20) mostrou-se o mais eficiente: a cada litro de acetonitrila p.a. (Merck, Riedel ou Carlo Erba) foram adicionados 100 ml de solução 0,3 M de n-octanoato de sódio em n-octanol. Esta solução foi obtida fazendo-se reagir n-octanol (Merck, p.a.) com sódio metálico (Merck, p.a.). Após 2 horas de refluxo, a mistura foi destilada com uma vazão de 500 ml/h, alcançada pela regulagem da razão de refluxo. Descartaram-se 170 ml de um resíduo amarelo escuro. A cada 100ml do destilado acrescentou-se 1 ml de ácido sulfúrico (Merck, p.a.) concentrado e a mistura foi destilada com o emprego de coluna tipo Vigreux, recolhendo-se 50 ml/h de acetonitrila e descartando-se os 15% iniciais. O destilado foi feito passar por uma coluna de 35 cm de comprimento (D.I. 2,5 cm) contendo alumina neutra, atividade 1 (70 - 230 mesh) Merck, e destilado novamente (150 ml/h). A cada 2 litros produzidos a alumina era ativada a 280°C, durante 2 horas. A figura nº 4 mostra os espectros de absorção no ultravioleta de acetoni-

trila espectrométrica Merck, acetonitrila purificada como descrito acima a partir do produto p.a. e acetonitrila p.a. Riedel.

METANOL

Empregou-se o metanol Merck p.a. e também Carlo Erba p.a. O processo de purificação (21) utilizado está descrito aqui para quantidade de 1 litro e consiste inicialmente, do tratamento de placas de alumínio. Um pedaço de alumínio, de aproximadamente 3 g, foi lavado com 50 ml de metanol para eliminar as gorduras. Em seguida, efetuou-se a corrosão da placa, deixando-a em contato, por 3 minutos, com 100 ml de solução 2 N de hidróxido de sódio (Merck p.a.). Transferiu-se a placa para um papel de filtro adaptado em um funil e lavou-se várias vezes com água deionizada até que, mediante uso de indicador, não mais foi observada a presença de base. Na sequência, colocou-se a placa em um Becker contendo 40 ml de solução 2% de MgCl (Reagen p.a.) por alguns segundos. Após lavada com água deionizada e metanol, foi transferida para o interior de 1 litro de metanol p.a. Decorrido o tempo de 5 horas, fez-se a destilação, recolhendo-se 500 ml/hora e descartando-se os 50 ml finais. Então, o destilado recebeu 0,5 g de ácido sulfanílico (Merck, p.a.) e sofreu nova destilação usando-se a coluna "Vigreux" e sendo controlada a razão de refluxo de forma a recolher 100 ml/hora. A figura nº 5 mostra espectros de absorção no ultravioleta de metanol: Carlo Erba R.S. (espectrométrico), metanol purificado como descrito e metanol

Carlo Erba p.a.

CLOROFÓRMIO

Como material de partida, empregou-se o clorofórmio Carlo Erba p.a. Em um balão de fundo chato, colocou-se 60% de clorofórmio e 40% de solução 0,1 N de hidróxido de sódio – (Merck p.a.) e durante trinta minutos agitou-se em um agitador mecânico (22). Por meio de um funil de separação, isolou-se o clorofórmio e foi repetida a operação acima sendo o clorofórmio separado novamente. Em seguida, agitou-se com água gelada (30%) durante trinta minutos e o clorofórmio foi separado, ainda com o emprego do funil. Então, procedeu-se uma destilação com 1 g de carbonato de potássio (Merck p.a.) por litro de clorofórmio com uma vazão de 200 ml/hora. A figura nº 6 mostra espectros de absorção no ultravioleta das seguintes amostras: clorofórmio espectrométrico (Merck), clorofórmio purificado tal como descrito e clorofórmio p.a. (Merck)

DICLOROMETANO

Com a técnica descrita abaixo (21), foi purificado diclorometano p.a. de várias marcas (Merck, Carlo Erba, Reagen).

Algumas pastilhas de hidróxido de sódio p.a. (Merck) foram acrescentadas a 1 litro de diclorometano e o sistema posto em refluxo por 1 hora e em seguida destilado, empregando coluna tipo "Vigreux". Foram descartados os 25 ml iniciais e os 50 ml finais e a vazão foi de 100 ml/hora. A figura

nº 7 mostra espectros de absorção no ultravioleta de amostras de diclorometano:espectrométrico Merck, purificado pela técnica acima e p.a. Merck.

TÉCNICAS EMPREGADAS

CENTRIFUGAÇÃO:

A centrifugação foi realizada visando eliminar a parte polimérica do OCCC. Amostras do óleo dispersas em acetonitrila (5%) foram centrifugadas a 15.000 r.p.m. durante 30 minutos à temperatura ambiente, aparecendo um material precipitado. No sentido de observar a reprodutibilidade, foram obtidos os pesos dos precipitados devidamente lavados com acetonitrila, a qual era totalmente eliminada por evaporação. O resultado de 8 medidas é mostrada na Tabela da pagina 21. A centrífuga empregada foi Sorvall Superspeed Centrifuge, tipo SS-1.

CRONATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA:

A cromatografia em camada delgada que foi empregada para acompanhar a retirada da parte polimérica por centrifugação, foi levada a efeito montando-se placas (5x20) com sílica gel - S (Merck) usando um equipamento Prodicil. Espalhou-se nas placas a sílica com 66% de água e tais cromatoplacas foram ativadas por 2 horas 110°C, marcando-se 13 cm da linha de base ao front. A fase móvel apresentava a seguinte composição (V/V): éter de petróleo, éter etílico e ácido fôrmi-

co (70 : 30 : 1) (23). O revelador empregado foi uma mistura de etanol, ácido sulfúrico e anisaldeído (V/V): (90 : 5 : 5). Amostras de óleo total, do sobrenadante da centrifugação e do precipitado foram dissolvidas em clorofórmio e cromatografadas. Quanto ao sobrenadante, eliminou-se a acetonitrila por evaporação e então o material fixo foi dissolvido em clorofórmio. O precipitado, antes da dissolução foi lavado várias vezes com acetonitrila. A figura nº 8 reproduz o cromatograma do sobrenadante da centrifugação.

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR:

Na cromatografia de exclusão molecular, foram usadas colunas de alta eficiência μ -Styragel-10 μ - 100 Å (Millipore-Waters), com o emprego inclusive de duas colunas em série tendo diclorometano como fase móvel. A detecção foi realizada no ultravioleta a 254 nm, fluxo de 1,5 a 30 ml/min, temperatura de 40°C, velocidade do papel de 0,5 a 1 cm/min. e atenuação de 0,4 a 0,8 AUFS.

O cromatógrafo a líquido usado, que foi o mesmo ao longo de todo o trabalho, é da marca Spectra-Physics, modelo SP-8000, pertencente a última geração em aparelhos deste tipo. O equipamento é composto de: reservatório para três solventes, permitindo a realização de gradiente ternário; sistema de degaseificação de solventes, por borbulhamento de Hélio; compartimento da coluna termostaticado; detector de absorção no ultravioleta fixo em comprimento de onda 254 nm; bomba de duplo pistão recíprocante; um versátil microproces-

sador que permite, em segundos, a alteração, por exemplo, da rotação do motor da bomba, mudando a vazão para um valor desejado, ou permite, com máxima rapidez, a alteração da temperatura no compartimento da coluna ou, ainda, a mudança da composição da fase móvel; válvula injetora de amostra com loop de capacidade fixa 10 μl .

Foram cromatografadas amostras do óleo, do sobrenadante da centrifugação e do precipitado. As figuras nºs 9, 10 e 11 mostram estes cromatogramas, respectivamente. Eram injetados sempre 10 μl na concentração de 0,25% a 1% em diclorometano ou 5% até 10% na cromatografia preparativa onde o sobrenadante da centrifugação era injetado. Na preparativa foi recolhido, várias vezes, o material relativo ao primeiro pico (pico 1) que corresponde a parte polimérica e que após ser concentrado foi recromatografado. (figura nº 13). Como a cromatografia de exclusão molecular acabou por separar também componentes monoméricos, recolheu-se o material (pico 2) correspondente ao pico mais próximo do da parte polimérica e, separadamente, recolheu-se o material relativo ao pico seguinte (pico 3) os quais foram concentrados e recromatografados (figuras nºs 14 e 15). Em toda a operação preparativa, o material era recolhido em frasco escuro, sob atmosfera de nitrogênio e mantido a baixa temperatura. A figura nº 12 mostra o cromatograma do óleo total.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO:

O sobrenadante da centrifugação do óleo em acetonitrila foi diluído com acetonitrila até atingir concentrações da ordem de 3% ou menos e cromatografado em coluna contendo fase reversa (Hibar - Merck - RP - 18 - Lichrosorb - 10 μ m).

As condições empregadas foram:

- Fase Móvel: acetonitrila-água (66 : 34) a (58 : 42)
- Temperatura do forno: 40°C;
- Vazão: 1 ml/min. a 2 ml/min.;
- Concentração: 1% a 3% em acetonitrila;
- Velocidade do papel: 0,25 cm/min. a 2 cm/min.
- Detecção: absorção no ultravioleta (254 nm);
- Atenuação: 0,2 AUFS a 0,8 AUFS.

Tyman (15) desenvolveu uma separação de componentes do óleo usando fase reversa e acetonitrila-água - (66 : 34) como fase móvel, porém empregou o óleo total, ou seja, sem a eliminação da parte polimérica, dissolvido em clorofórmio. As separações conseguidas neste trabalho, revelaram novos picos que não haviam sido encontrados por Tyman. O pico correspondente ao cardol triênico (15) apareceu desdobrado em quatro outros e o cardanol triênico em cinco picos (figuras nºs 19 e 20).

No sentido de identificar o material correspondente a estes novos picos que apareceram e até de confirmar uma primeira suposição de que se tratavam de isômeros geométricos dos constituintes triênicos do cardol e cardanol, realizou-se um

trabalho preparativo. O material correspondente a cada pico era recolhido em frasco escuro, sob atmosfera de nitrogênio e a baixa temperatura e armazenado durante a noite nestas condições. A única mudança que existiu em relação as condições usadas anteriormente na cromatografia analítica, foi a concentração que passou a ser de 5% a 10%, ainda em acetonitrila. Cerca de quarenta injeções foram realizadas sendo que, antes de cada nova injeção, cerca de 5 ml de acetonitrila eram passados pela coluna para remoção completa de todos os componentes do óleo, inclusive oligômeros. As amostras foram nomeadas cardol 1, cardol 2, cardol 3 e cardol 4, no sentido do menor ao maior tempo de retenção. Quanto ao cardanol, o primeiro e segundo picos foram recolhidos num único frasco rotulado como cardanol 1. Os demais foram chamados, em ordem crescente dos tempos de retenção, de cardanol 2, cardanol 3 e cardanol 4. (Figura nº 20)

ESPECTROMETRIA DE MASSAS:

As amostras foram enviadas ao Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, no Rio de Janeiro, para a obtenção dos seus espectros de massas, com instruções para que fossem conseguidas condições de operação que tornassem o pico do íon molecular proeminente. O instrumento utilizado foi um V.G. Micro Mass 11, a temperatura foi de 250°C e a energia de ionização de 70 eV. Para o cardol 2 também foi obtido um espectro com 12eV e para o cardol 3 e cardol 4 foi usada uma ampliação de escala de cinco vezes (figuras nºs 22, 23, 24, 25 e 26). Para as amostras nomeadas cardanol, e que aparecem nos espectros como cardan,

tivemos as mesmas condições anteriores de operação. Para o cardanol 2 foi obtido, ainda, um espectro com 12 eV (figuras-nºs 27, 28, 29 e 30).

Um outro conjunto de amostras, recolhido anteriormente, foi enviado ao Centro de Pesquisa da Rhodia, em São Paulo. Alegando impedimentos técnicos e pequena quantidade de amostra, o operador conseguiu apenas espectro da amostra cardol 2 (figura nº 31).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PURIFICAÇÃO DE SOLVENTES

Na cromatografia líquida, os solventes que vão constituir a fase móvel representam um dos fatores que influenciam a separação. É desejável que o solvente apresente um conjunto de propriedades (24) sendo que as principais são:

- a) Ser puro, não apresentar contaminantes;
- b) Não reagir com a fase estacionária;
- c) Ser compatível com o detector;
- d) Dissolver a amostra.

É a pureza do solvente uma consideração importante em uma separação por CLAE. As impurezas alteram as características da fase móvel e também interferem na detecção. Em uma operação envolvendo eluição gradiente, a pureza do solvente torna-se ainda mais importante: admita-se um processo cromatográfico, com eluição gradiente, onde, inicialmente, percola através da coluna, um solvente com baixo poder de eluição, para aquela coluna, e que contenha impurezas que absorvam no ultravioleta; admita-se ainda que estas impurezas fiquem fortemente retidas. Durante o tempo em que esta fase móvel atravessar a coluna, as impurezas estarão se concentrando no topo da coluna; quando o poder de eluição aumen-

tar, serão removidas da coluna e se estiver sendo usado um detector de absorção no ultravioleta, elas serão inevitavelmente detectadas, produzindo variações na linha de base e picos que prejudicam a detecção dos picos de interesse. Um gradiente realizado na ausência da amostra determina se o eluente mais fraco é próprio ou necessita ser purificado.

ÁGUA

No cromatograma da figura nº 1 pode-se observar que, realmente, o uso da água sem nenhum processo de purificação, é totalmente impraticável em cromatografia líquida. Na figura nº 2 observa-se que a deionização, seguida de destilação, é ineficiente para purificar a água visando uso em operação gradiente. Na figura nº 3, tem-se o efeito da coluna Lobar na purificação da água, embora a eficiência tenha sido menor que a de alguns resultados na literatura.

Durante o presente trabalho, foi utilizada, exclusivamente, eluição isocrática nas separações cromatográficas dos constituintes do OCCC e a água obtida mostrou-se inteiramente satisfatória. O metanol acrescentado à água purificada tem por objetivo evitar o crescimento de fungos.

ACETONITRILA

Observa-se, pelos espectros da figura nº 4, que o processo descrito para purificação da acetonitrila (20) remove, com eficácia, as impurezas que absorvem no ultravioleta.

Dentro deste aspecto, o solvente purificado por este método mostrou-se superior ao produto comercial nacional Merck para cromatografia.

METANOL

A figura nº 5 mostra que, em termos de absorção no ultravioleta, a técnica adotada para a purificação do metanol é eficiente (21).

CLOROFÓRMIO

Clorofórmio reage vagarosamente com o oxigênio, quando exposto ao ar e luz, sendo que os principais produtos da decomposição são o cloreto de carbonila (fosgênio) e o cloreto de hidrogênio (22); por esta razão realizou-se a agitação com solução aquosa de hidróxido de sódio. O etanol, outra impureza presente no clorofórmio, é removido pela agitação com água gelada. O carbonato de potássio se fez presente na destilação com o objetivo de tornar o clorofórmio totalmente anidro. A figura nº 6 mostra os espectros de absorção no ultravioleta de amostras de clorofórmio, onde observa-se que o clorofórmio obtido é superior ao produto comercial espectrométrico.

DICLOROMETANO

Com o método simples de purificação do diclorometano (21) descrito anteriormente, excelentes resultados fo-

ram conseguidos. Os espectros de absorção no ultravioleta aparecem na figura nº 7.

TÉCNICAS EMPREGADAS

CENTRIFUGAÇÃO

A mistura mais conveniente para a separação da parte altamente polimérica, entre várias testadas, foi de 5% do OCCC em acetonitrila. Foi observado que a centrifugação, realizada em rotações maiores (até 50.000 rpm), não afeta de forma significativa a quantidade do precipitado. A média das percentagens do material precipitado, em relação ao óleo original, foi de 7,84% com um desvio padrão de 0,14% - Tabela na página nº 21.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada mostrou-se altamente reproduzível e o revelador constituído de etanol, anisaldeído e ácido sulfúrico, eficiente para a visualização dos fenóis. Os valores de R.F. para os principais componentes foram 0,19 para o cardol, 0,38 para o 2-metil cardol e 0,56 para o cardanol (figura nº 8) concordantes com a literatura (23). Os componentes, após a revelação se apresentam com as seguintes colorações: cardol: rosa; 2-metil-cardol: roxo azulado; cardanol: roxo.

TABELA: ISOLAMENTO DA FRAÇÃO ALTAMENTE POLIMÉRICA DO OCCO POR CENTRIFUGAÇÃO

Nº DO TUBO	% DE MATERIAL POLIMÉRICO
1	7,79
2	7,84
3	8,03
4	7,87
5	7,81
6	7,85
7	7,57
8	7,98

$$\bar{\mu} = 7,84\%$$

$$\bar{s} = 0,14\%$$

Solvente: Acetonitrila

Temperatura: Ambiente

Concentração: 5%

15.000 rpm - 30 min.

O sobrenadante da centrifugação apresenta menor quantidade de polímeros e oligômeros que o óleo original, conclusão que pode ser tirada por simples observação das cromatoplasmas, ou seja, para a mesma intensidade das manchas dos componentes monoméricos, observa-se que o rastro deixado nas imediações da base é bem menos intenso quando empregado o sobrenadante da centrifugação, no lugar do óleo total. Cromatografando-se o precipitado, depois de o tubo ter sido lavado várias vezes com acetonitrila, observou-se muito pouco dos componentes monoméricos, pois as manchas relativas ao cardol, cardanol e 2-metil cardol praticamente despareceram.

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Uma análise dos cromatogramas da cromatografia de exclusão molecular revela a retirada da fração altamente polimérica, mas deixa claro a presença de oligômeros no sobrenadante - figuras nºs 9, 10 e 11. Uma simples normalização de áreas, considerando fatores de resposta iguais, ajuda a mostrar que o precipitado apresenta pequena quantidade de monômeros. Provavelmente devido a fenômenos de adsorção, observa-se nos cromatogramas a separação parcial dos monômeros.

As figuras nºs 12, 13, 14, 15 e 16 indicam que, para isolar com eficácia a parte polimérica dos monômeros, deve-se realizar uma separação preparativa por cromatografia de exclusão molecular. Nos cromatogramas que aparecem nas

figuras nº^s 14 e 15, uma pequena quantidade de material polimerizado se faz presente, devido ao tempo decorrido entre o recolhimento do material na preparativa e a nova injeção, apesar de ter sido recolhido e armazenado em atmosfera de nitrogênio, frasco escuro e temperatura baixa. No cromatograma da figura nº 16 relativo ao pico nº 2, este problema desaparece, pois, o cromatograma foi obtido logo após o término da técnica preparativa.

Conclui-se, então, que a técnica da centrifugação é útil no sentido de retirar a parte altamente polimérica, porém, quando se deseja os monômeros completamente isolados de polímeros e oligômeros, deve-se recorrer a cromatografia de exclusão molecular.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO

Na cromatografia, empregando coluna com fase reversa, pode-se atribuir o aparecimento de picos não revelados na literatura (15) ao seguinte:

- a) Maior eficiência da coluna empregada;
- b) Tratamento prévio da amostra: Tyman dissolveu a amostra do óleo total, ou seja, contendo a parte polimérica, em clorofórmio e usou, como fase móvel, acetonitrila-água. De acordo com Snyder (24), quanto maior o poder de eluição do solvente da amostra, em relação a fase móvel, mais prejudicialmente será afetada a resolução e a forma dos picos. No presente trabalho, o óleo foi disperso em acetonitrila e centrifugado,

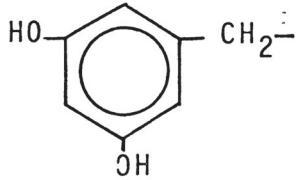
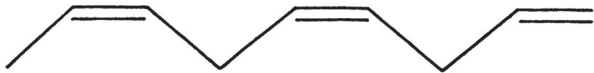
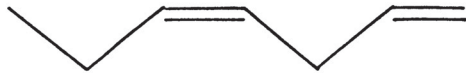


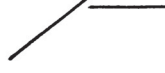

eliminando-se componentes de maior peso molecular e a solução resultante foi cromatografada. Portanto, a amostra estava dissolvida em acetonitrila que tem menor poder de eluição que o clorofórmio quando se usa cromatografia com fase reversa. A figura nº 17 mostra o cromatograma realizado com a amostra sendo dissolvida em clorofórmio e as separações das figuras nº 18, 19, 20 e 21 foram obtidas usando acetonitrila para dissolver a amostra.

Comparando-se as figuras nº 18 e 19 observa-se o aumento do parâmetro k' (retenção) pela mudança da composição da fase móvel acetonitrila-água de (66 : 34) para (60 : 40), aumentando a resolução. Fazendo a comparação entre os cromatogramas das figuras nº 19 e 20, observou-se a influência da vazão na resolução. A seletividade maior, proporcionada pelo sistema acetonitrila-água em relação ao sistema metanol-água, é vista observando-se os cromatogramas das figuras nº 20 e 21.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Observa-se nos espectros de massas mostrados nas figuras nºs 22, 23, 24, 25 e 26 que as amostras nomeadas cardol 1, cardol 2, cardol 3, cardol 4 são realmente isômeros geométricos, pois todos apresentam o mesmo íon-molecular - (Massa 314). O número de isômeros previsto para o cardol trieno é realmente quatro (Cis-cis, cis-trans, trans-trans e trans-cis) já que uma dupla está na extremidade da cadeia

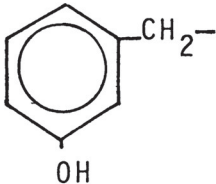
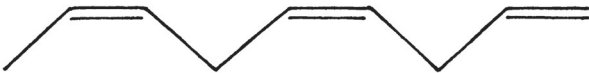
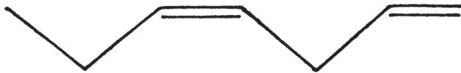


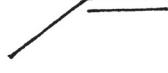

(16). Além disso, picos esperados de alguns fragmentos típicos de fato foram encontrados:

Fragmento	massa
	123
	121
	94
	81
	67
	41
	27

Observa-se que, tal como esperado, quando a energia de ionização mudar de 70 eV - (figura nº 23) para 12 eV - (figura nº 24) o pico do íon-molecular aparece mais intenso.

No espectro de massa da amostra denominada cardanol 1 (figura nº 27), onde foi recolhido o material relativo a dois picos no cromatograma, aparece o pico com massa 298 que é a esperada para o íon-molecular de um cardanol. No entanto, aparece também um pico de massa 328. Há citações na literatura (12) de componentes do OCCC com 17 carbonos na cadeia ligada ao anel que pode gerar um íon-molecular com a

massa 328. As amostras cardanol 2 (figuras nº 28 e 29) e cardanol 3 (figura nº 30) são realmente isômeros geométricos pois aparecem nos seus espectros de massa o mesmo íon-molecular (massa 298). O espectro da amostra cardanol 4 não permitiu tirar conclusões, pois acima da massa 220 não se identificam picos bem definidos, mas a julgar pelos fragmentos de menor massa, seria um dos isômeros geométricos com o nome cardanol trieno. As massas de fragmentos esperados para os cardanóis triênicos de fato aparecem nos espectros.

<u>Fragmento</u>	massa
	107
	121
	94
	81
	67
	41
	27

A figura nº 31 mostra o espectro obtido no Centro de Pesquisas da Rhodia para o cardol 2 e que revela também o íon-molecular apresentando massa 314.

CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos neste trabalho, observou-se que a purificação de solventes próprios para CLAE é perfeitamente viável de ser realizada em laboratório, evitando-se os custos proibitivos dos produtos disponíveis no mercado e muitas vezes superando-os em termos de qualidade.

A centrifugação constitui um método eficiente como preparação prévia do OCCC para a análise dos monômeros por CLAE pois elimina a fração altamente polimérica do óleo, permitindo que a fração restante seja injetada, dissolvida em um solvente compatível com a fase móvel, considerada ótima para a separação.

O isolamento total da parte polimérica e oligomérica só é possível por cromatografia de exclusão molecular, empregando colunas de alta eficiência.

Como o OCCC é uma mistura bastante complexa, as separações cromatográficas encontradas até o momento na literatura, apresentam alguns picos que correspondem a vários compostos. Com a otimização das condições de separação, o presente trabalho permitiu o desdobramento de isômeros geométricos dos constituintes triênicos do cardol e cardanol, comprovando esta separação com o apoio da espectrometria de massas.

O OCCC, pela sua complexidade, constitui um farto material de pesquisa, compostos até hoje não isolados do OCCC, certamente serão separados com o encontro de novas condições cromatográficas. O estudo da parte polimérica do OCCC, ainda escasso na literatura, constitui outra fonte de pesquisa de alto interesse.

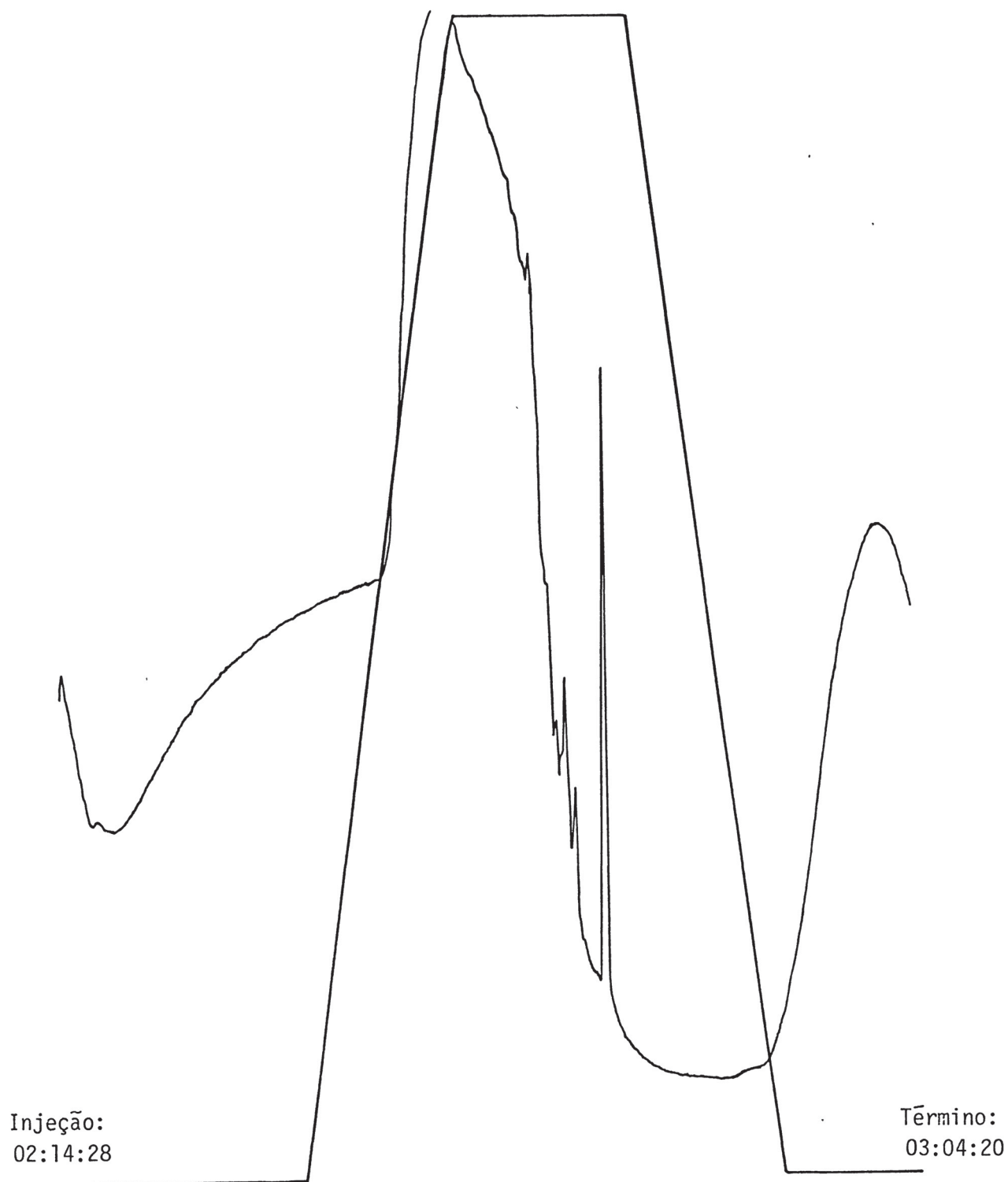


FIGURA Nº 1: H₂O₂ DA REDE DE CURITIBA

Vazão: 2 ml/min. Temperatura: 30°C Pressão: 1.000 psi
 Coluna: RP-8 (LiChrosorb - 10µm) Detector: UV - 254nm
 Fase Móvel: água da rede de Curitiba e metanol para espectrometria

Tempo(s)	Água	Metanol
0.0	100.0	0.0
15.0	100.0	0.0
25.0	0.0	100.0
35.0	0.0	100.0
45.0	100.0	0.0

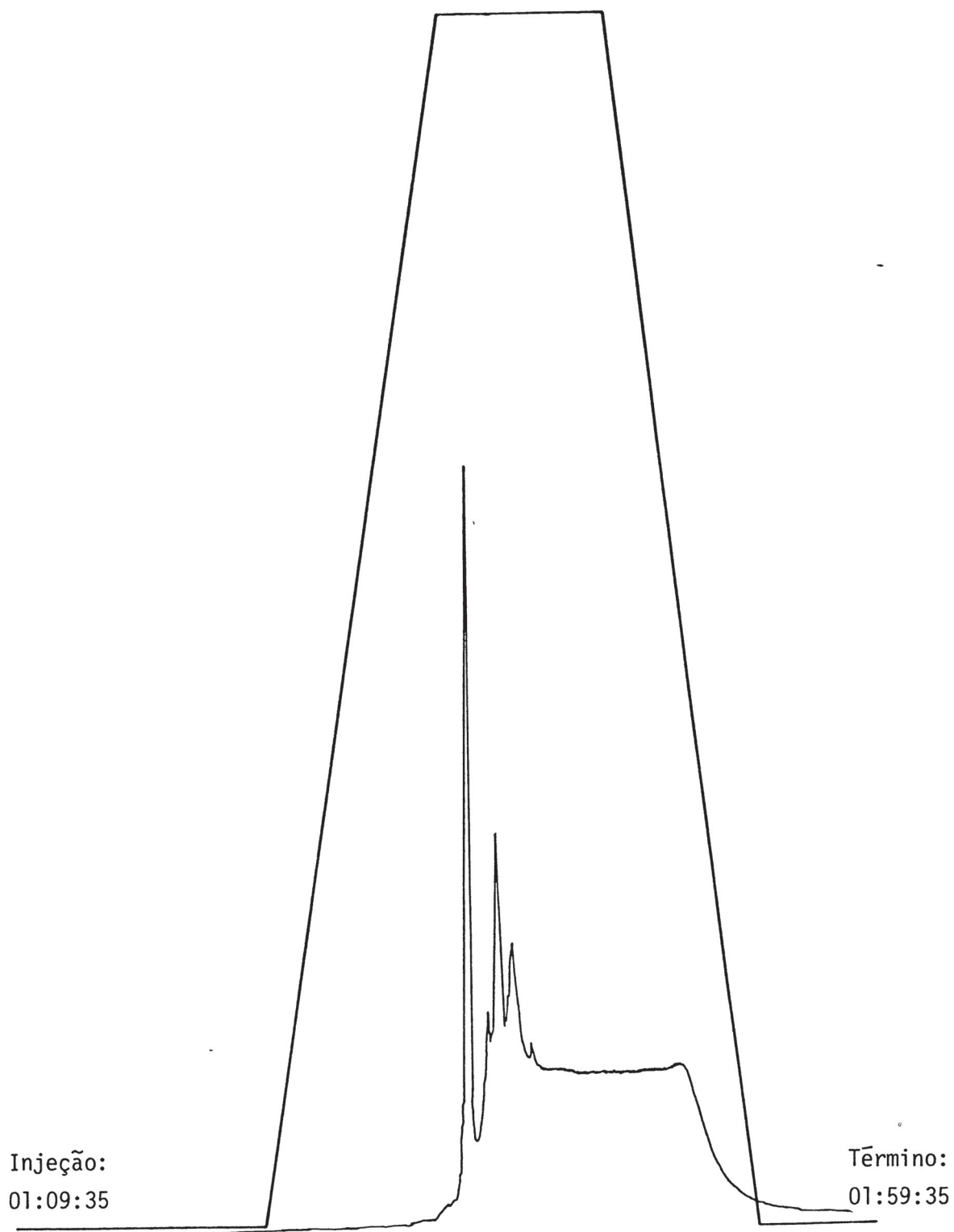


FIGURA Nº 2: H₂O DEIONIZADA E DESTILADA

Vazão: 2ml/min. Temperatura: 30°C Pressão: 1 523 psi
 Coluna: RP-8 (LiChrosorb - 10µm) Detector: UV - 254nm
 Fase Móvel: água deionizada e destilada e metanol para espectrometria.

Tempo(s)	Água	Metanol
0.0	100.0	0.0
15.0	100.0	0.0
25.0	0.0	100.0
35.0	0.0	100.0
45.0	100.0	0.0

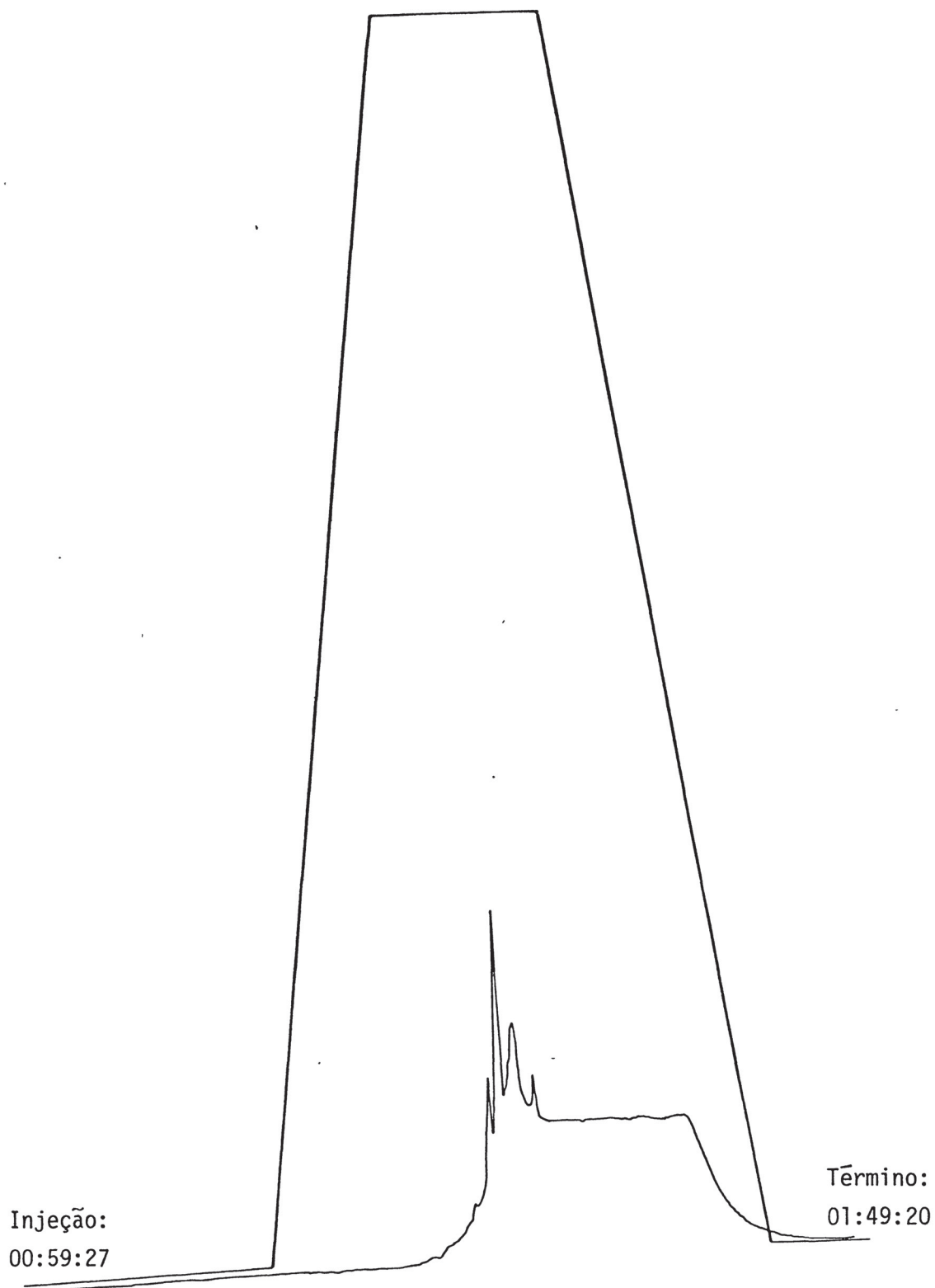


FIGURA Nº 3: H₂O DEIONIZADA, DESTILADA E PASSADA ATRAVÉS COLUNA LOBAR

Vazão: 2m/min. Temperatura: 30°C Pressão: 1 107 psi

Coluna: RP-8(LiChrosorb - 10µm) Detector: UV - 254nm

Fase Móvel: água deionizada, destilada e passada através coluna Lobar e metanol para espectrometria

Tempo(s)	Água	Metanol
0.0	100.0	0.0
15.0	100.0	0.0
25.0	0.0	100.0
35.0	0.0	100.0
45.0	100.0	0.0

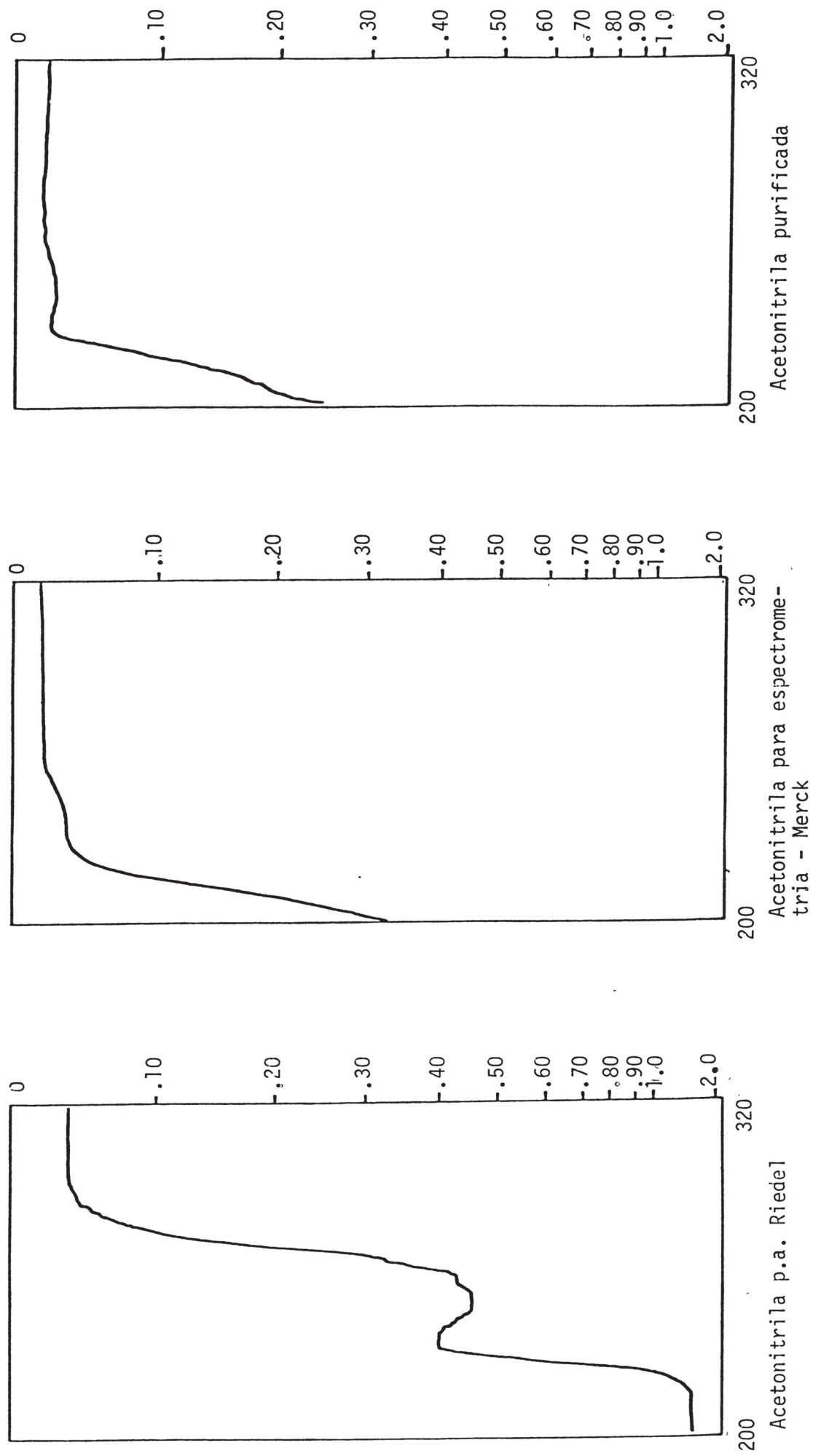
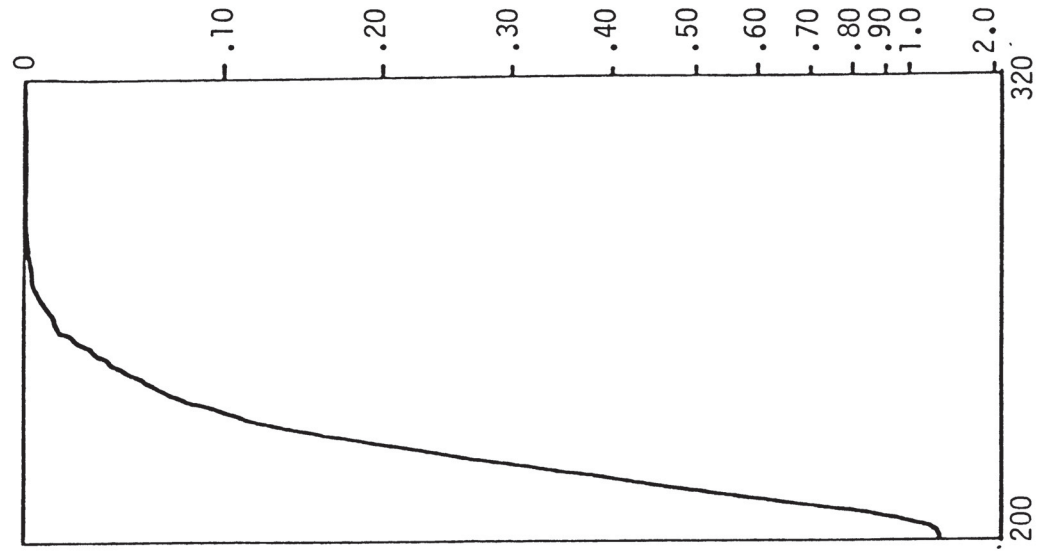
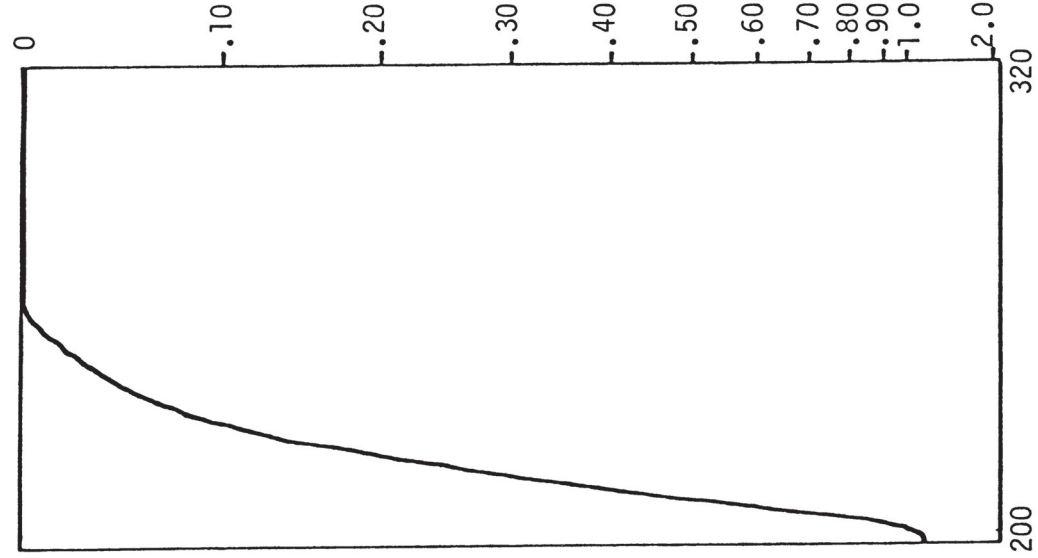


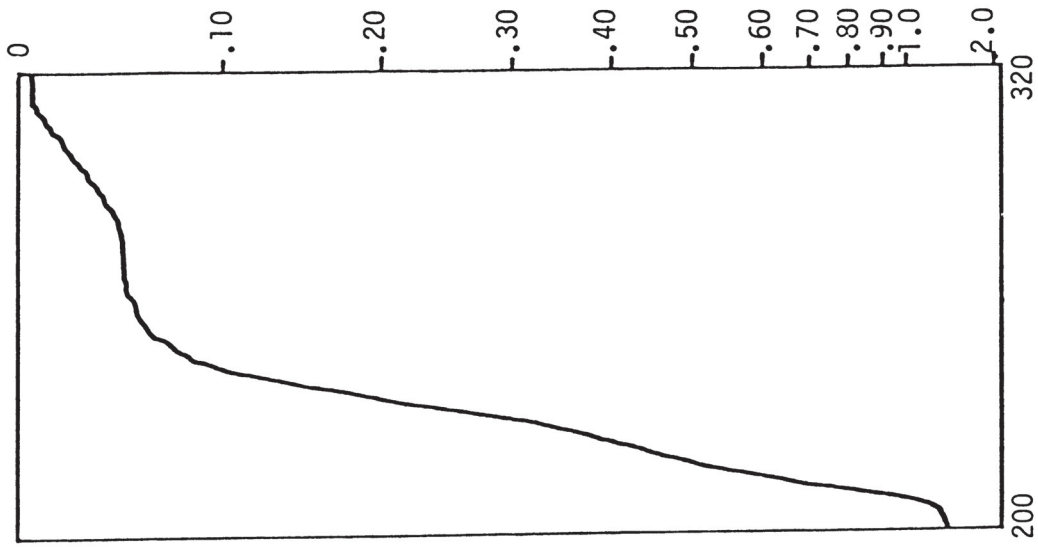
FIGURA Nº 4: ACETONITRILA - Espectro de Absorção no Ultravioleta



Metanol purificado



Metanol para espectrometria Carlo Erba



Metanol p.a. Carlo Erba

FIGURA Nº 5: METANOL - Espectro de Absorção no Ultravioleta

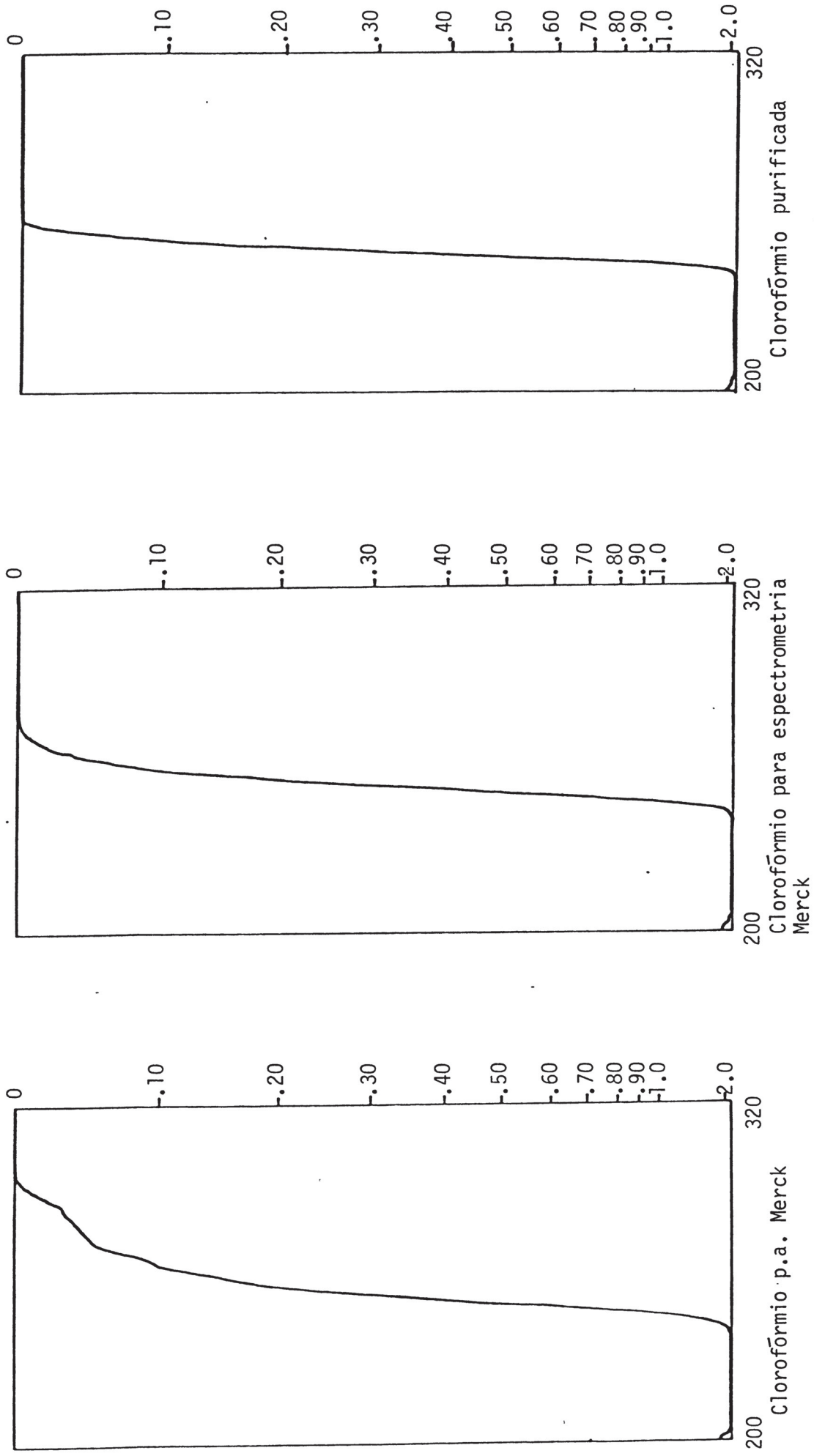


FIGURA Nº 6: CLOROFORMIO - Espectros de Absorção no Ultravioleta

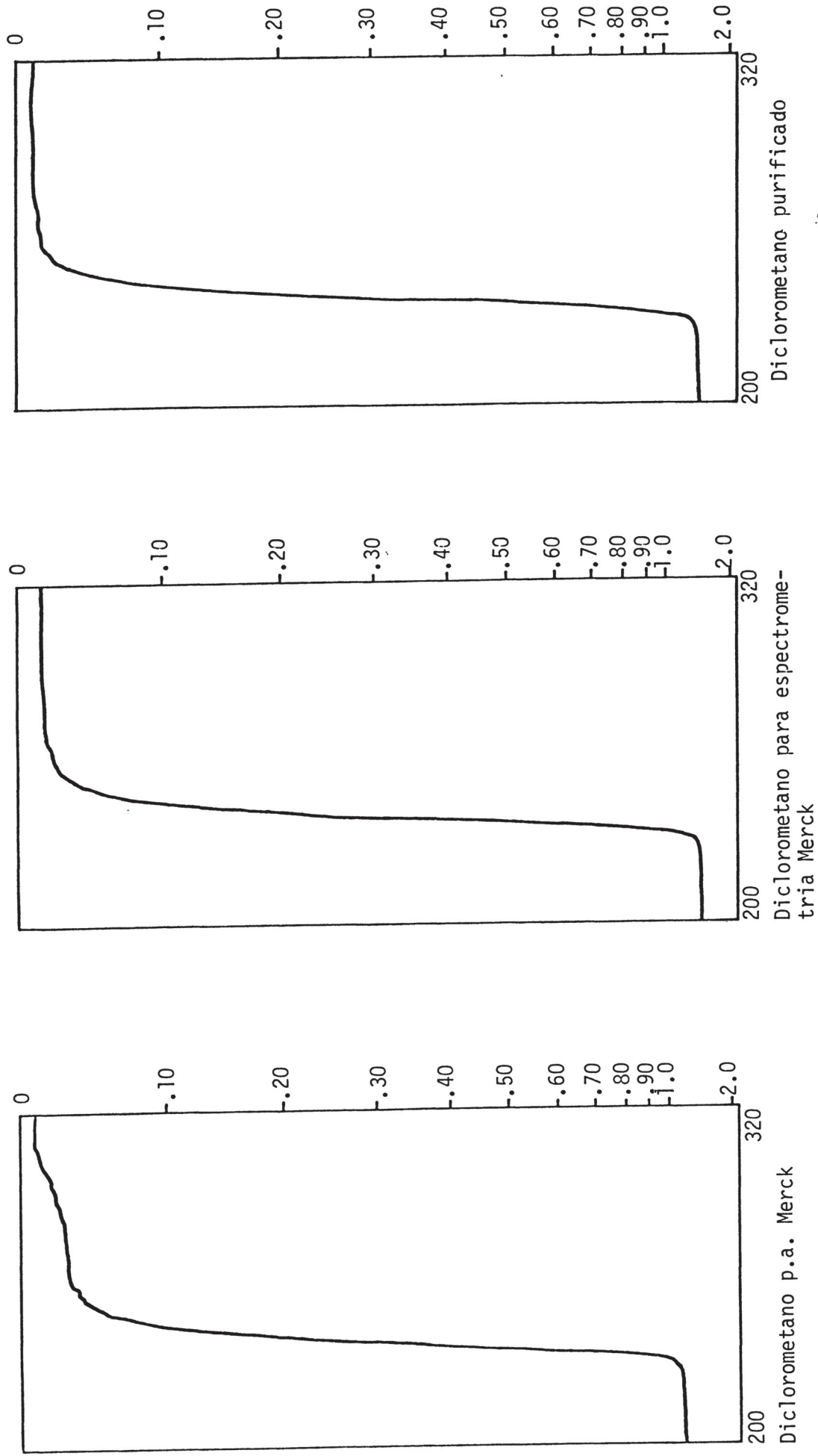
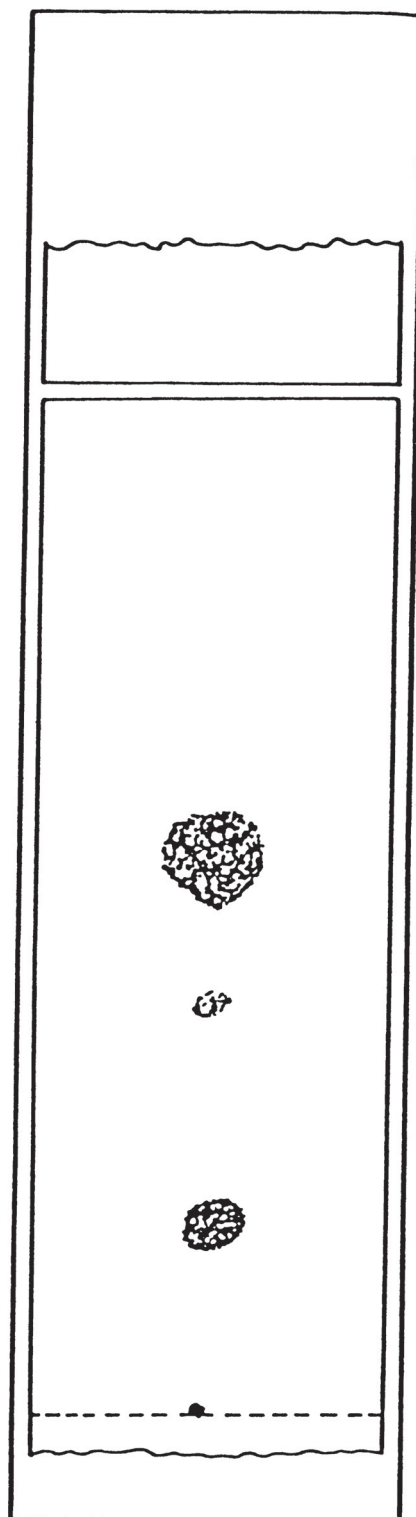


FIGURA Nº 7; DICLOROMETANO - Espectros de Absorção no Ultravioleta

SILICA GEL S
Fase Móvel:
Eter de Petróleo
Éter Etílico
Ácido Fórmico
(70:30:1)



Cardanol RF: 0,56

2-metil cardol RF: 0,38

Cardol RF: 0.19

FIGURA Nº 8: CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

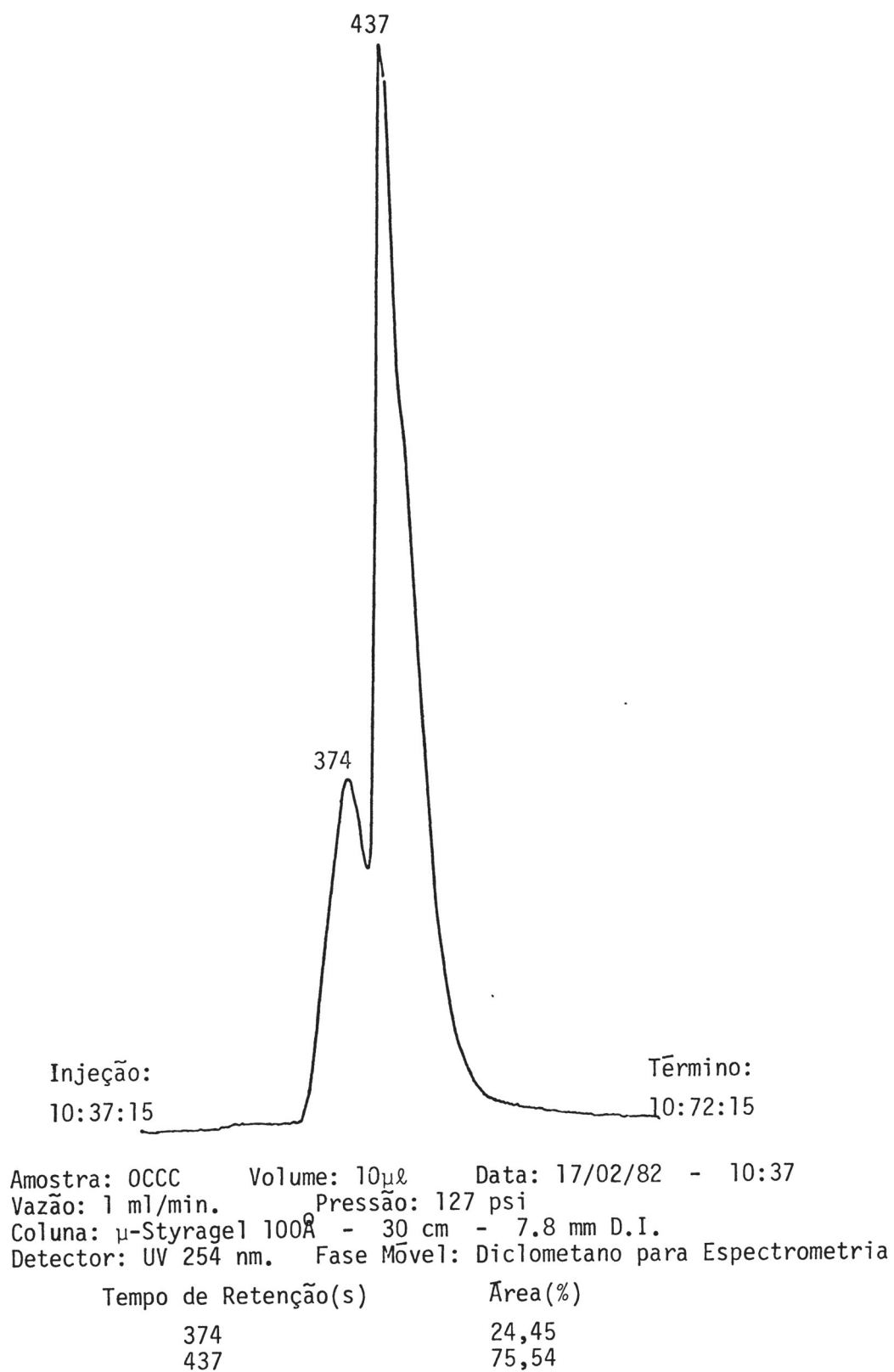
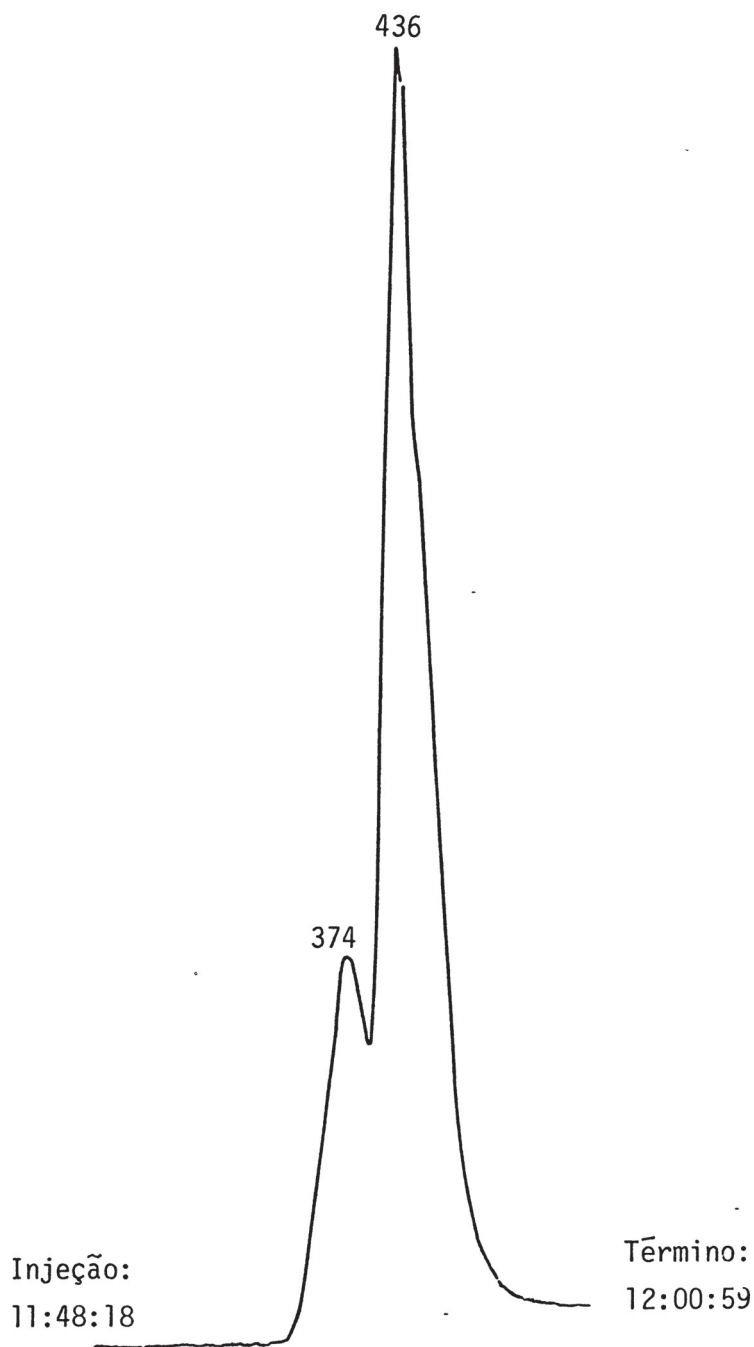


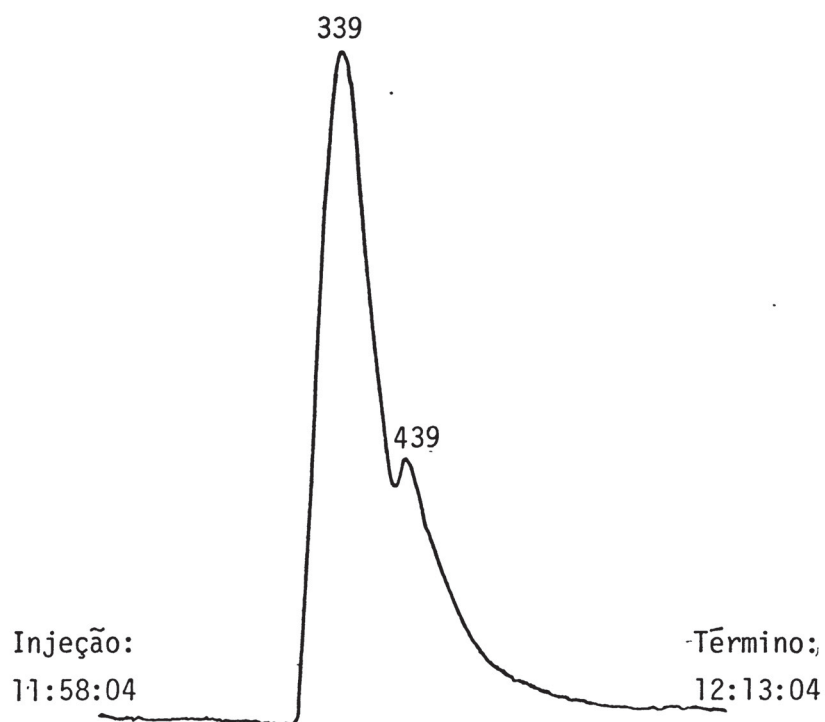
FIGURA Nº 9: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR



Amostra: Sobrenadante da Centrifugação do OCCC
Volume: 10 μ l Data: 18/02/82 Vazão: 1ml/min. Pressão: 115 psi
Coluna: μ -Styragel 100 Å - 30 cm - 7.8 mm D.I.
Detector: UV 254 nm.
Fase Móvel: Diclorometano para Espectrometria

Tempo de Retenção(s)	Área(%)
374	22,31
436	77,69

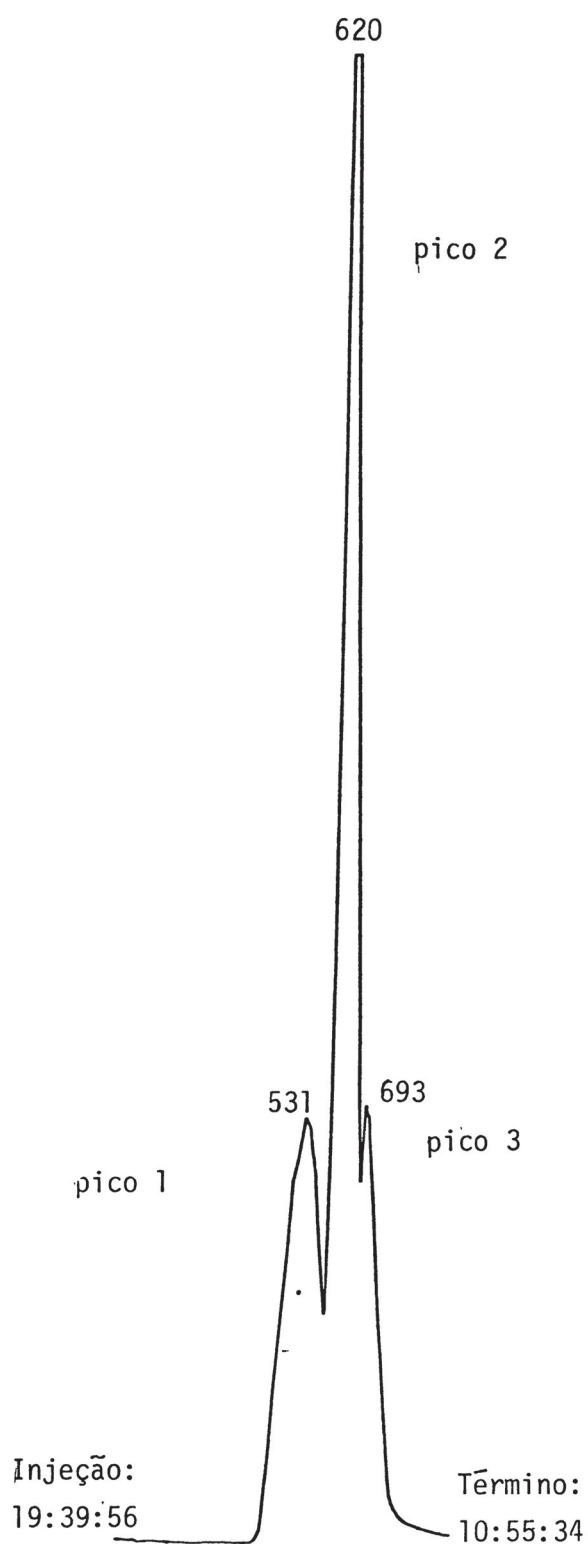
FIGURA Nº 10; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR



Amostra: Parte Polimérica do OCCC (precipitado da centrifugação)
Volume: 10 μ l
Data: 12/02/82 - 1:58
Vazão: 1ml/min.
Pressão: 137 psi
Coluna: μ -Styragel 100 Å - 30 cm - 3.8 mm D.I.
Detector: UV 254 nm
Fase Móvel: Diclorometano para Espectrometria

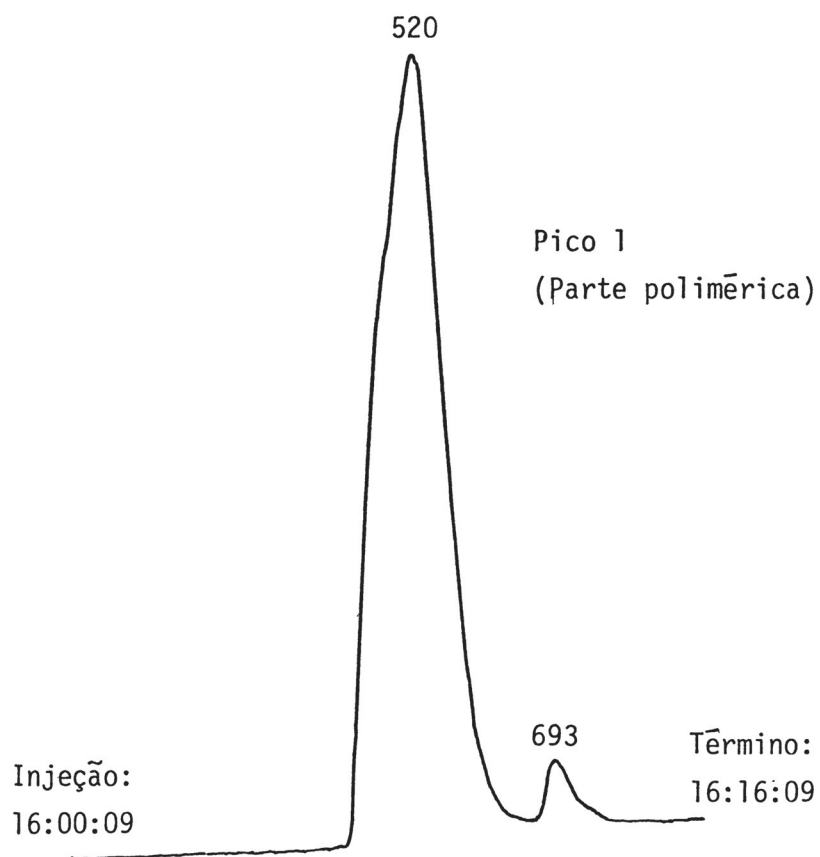
Tempo de Retenção(s)	Área(%)
339	97,24
439	2,75

FIGURA Nº 11: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR



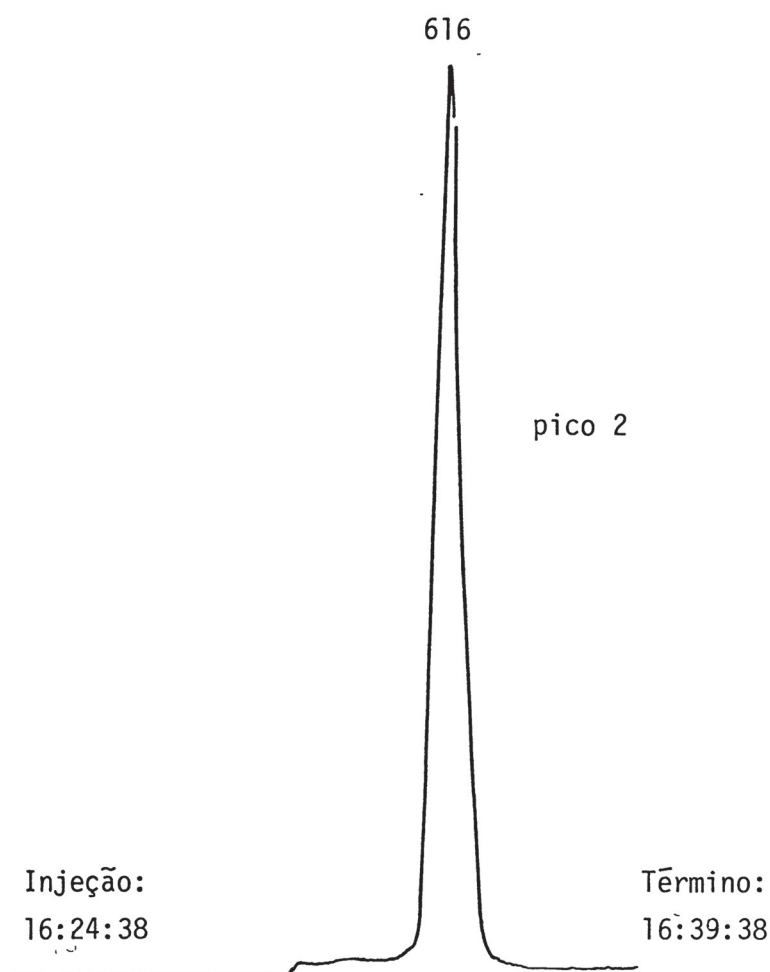
Amostra: OCCC Volume: 10 μ l Data: 01/04/82 10:39
Vazão: 1,5 m/min. Pressão: 1.108 psi
Coluna: μ -Styragel 100 Å - 30 cm - 7.8 mm D.I. (2 em série)
Detector: UV 254 nm
Fase Móvel: Diclorometano para Espectrometria

FIGURA Nº 12: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR



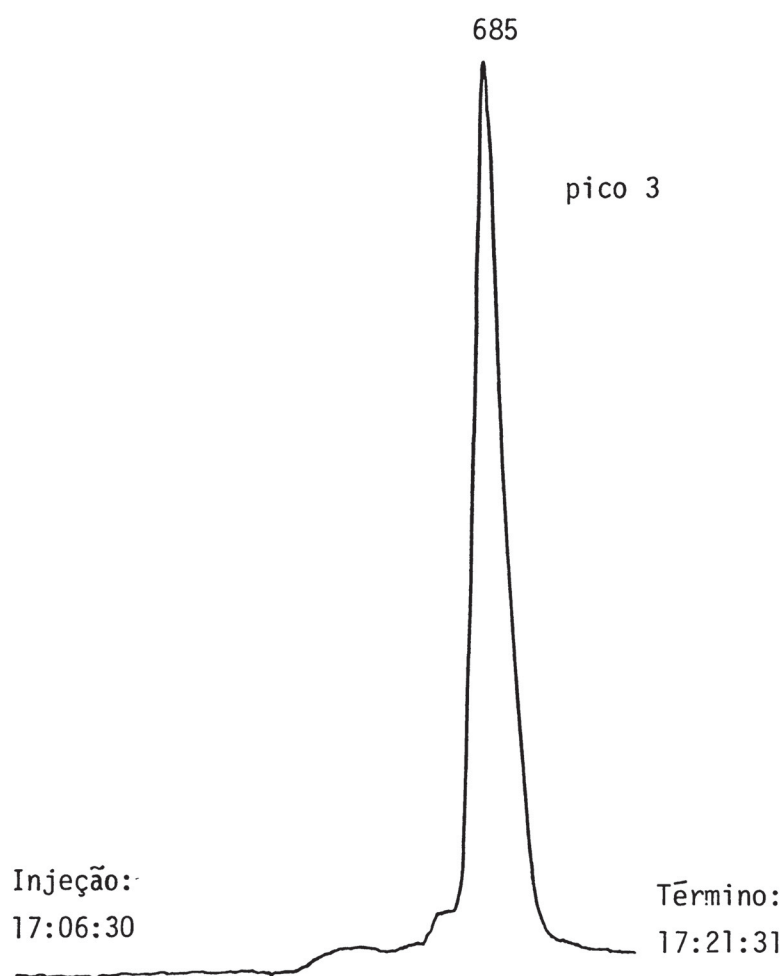
Amostra: parte polimérica (pico 1 da figura nº 12)
Volume: 10 μ l
Data: 07/04/82 16:00
Vazão: 1,5 ml/min.
Pressão: 1.094 psi
Coluna: μ -Styragel 100 Å - 30 cm - 7.8 mm D.I. (2 em série)
Detector: UV 254 nm
Fase Móvel: Diclorometano para Espectrometria

FIGURA Nº 13: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR



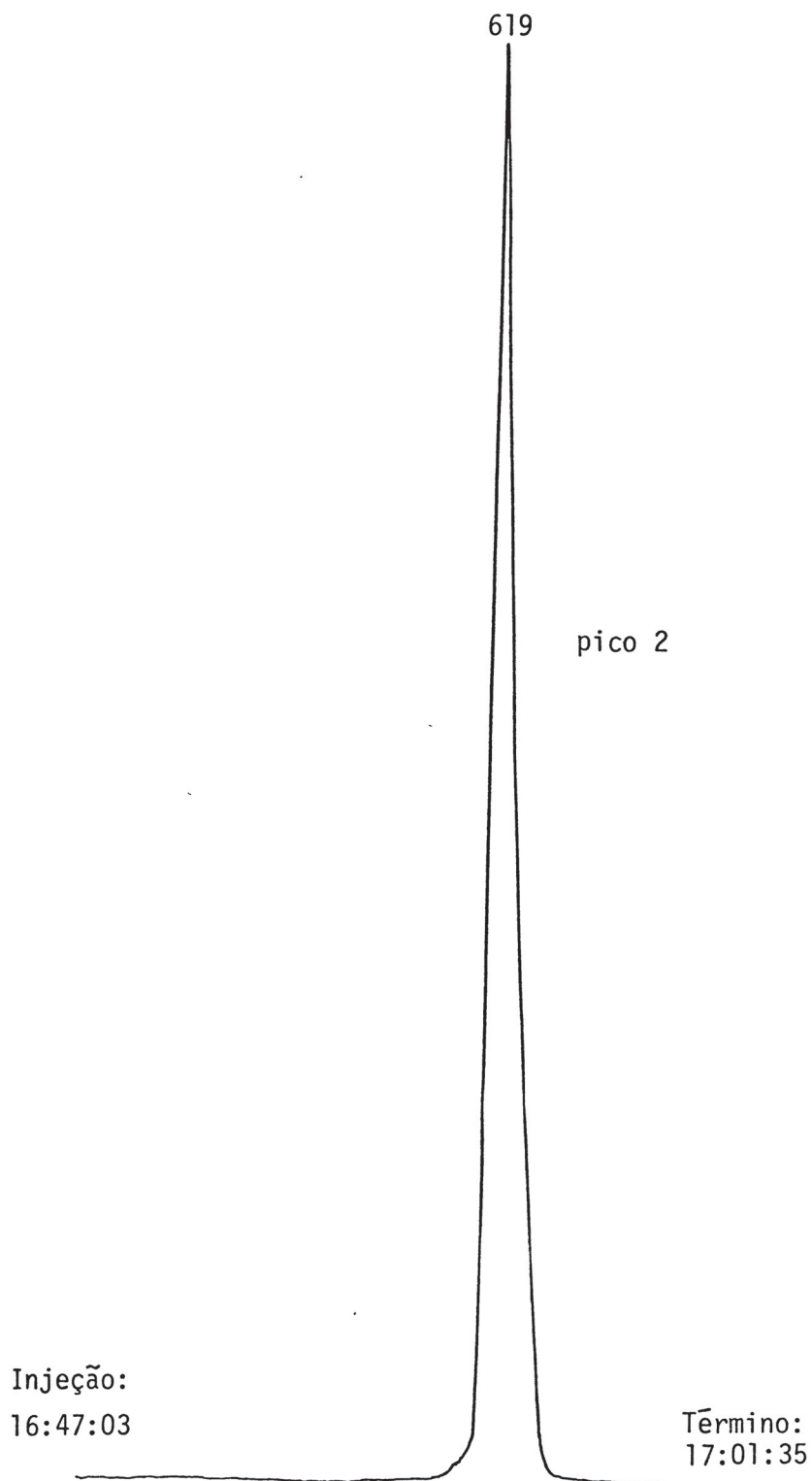
Amostra: Monômero (pico 2 da figura nº 12)
Volume: 10 μ l
Data: 07/04/82 16:24
Vazão: 1,5 ml/min.
Pressão: 1.074 psi
Coluna: μ -Styragel 100 Å - 30 cm - 7.8 mm D.I. (2 em série)
Detector: UV - 254 nm.
Fase Móvel: Diclorometano para Espectrometria

FIGURA Nº 14: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR



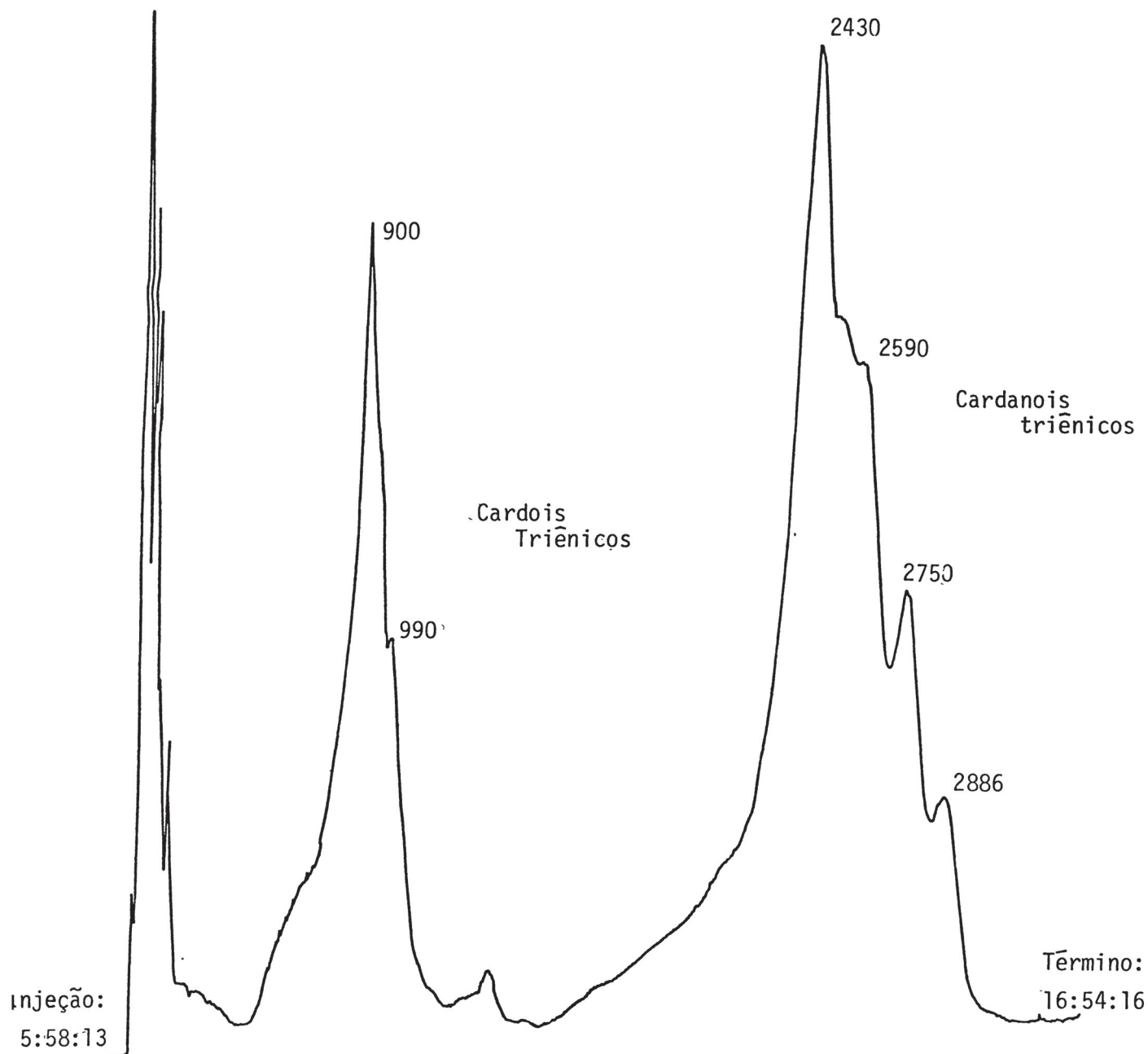
Amostra: Monômero (pico 3 da figura nº 12)
Volume: 10 μ l
Data: 07/04/82 17:06
Vazão: 1,5 ml/min.
Pressão: 1.077 psi
Coluna: μ -Styragel 100 Å - 30cm - 7.8 mm D.I. (2 em série)
Detector: UV - 254 nm
Fase Móvel: Diclorometano para Espectrometria.

FIGURA Nº 15; CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR



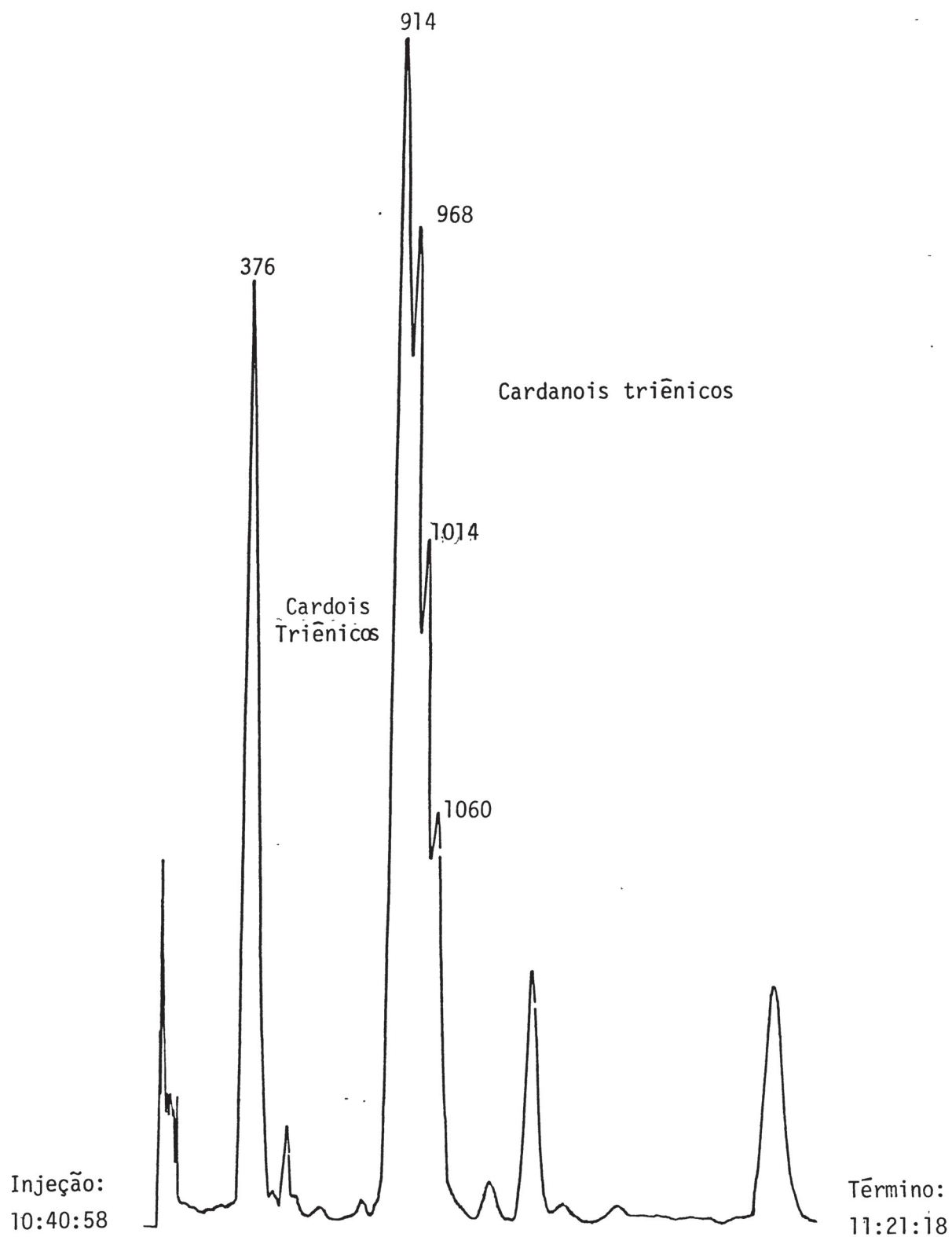
Amostra: Monômero (pico 2 da figura nº 12)
Volume: 10 μ l
Data: 01/04/82
Vazão: 1,5 ml/min.
Pressão: 1.174 psi
Coluna: μ -Styragel 100 Å - 30 cm - 7.8 mm D.I. (2 em série)
Detector: UV - 254 nm
Fase Móvel: Diclorometano para Espectrometria

FIGURA Nº 16: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR



Amostra: OCCC (sobrenadante dissolvido em clorofórmio)
 Volume: 10 μ l
 Data: 20/05/82 15:58
 Vazão: 1,2 ml/mjn.
 Temperatura: 40°C.
 Pressão: 654 psi
 Coluna: RP-18 (LiChrosorb - 10 μ)
 Detector: UV - 254 nm.
 Fase móvel: acetonitrila - água (58:42)

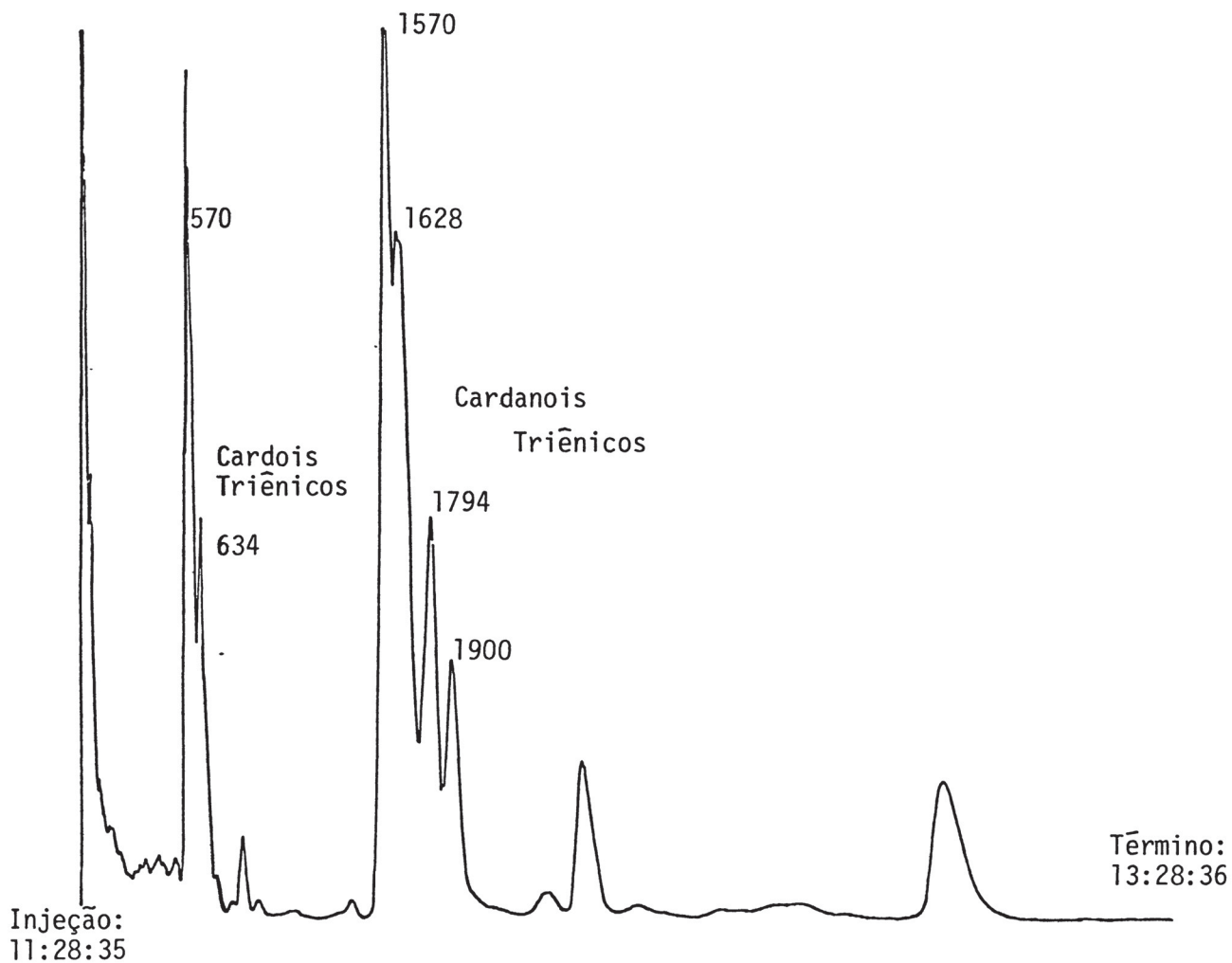
FIGURA Nº 17; CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO



Amostra: OCCC (sobrenadante dissolvido em acetonitrila)
Volume: 10 μ l
Vazão: 1,7 ml/min.
Pressão: 1455 psi
Detector: UV - 254 nm
Fase Móvel: Acetonitrila - água (66:34)

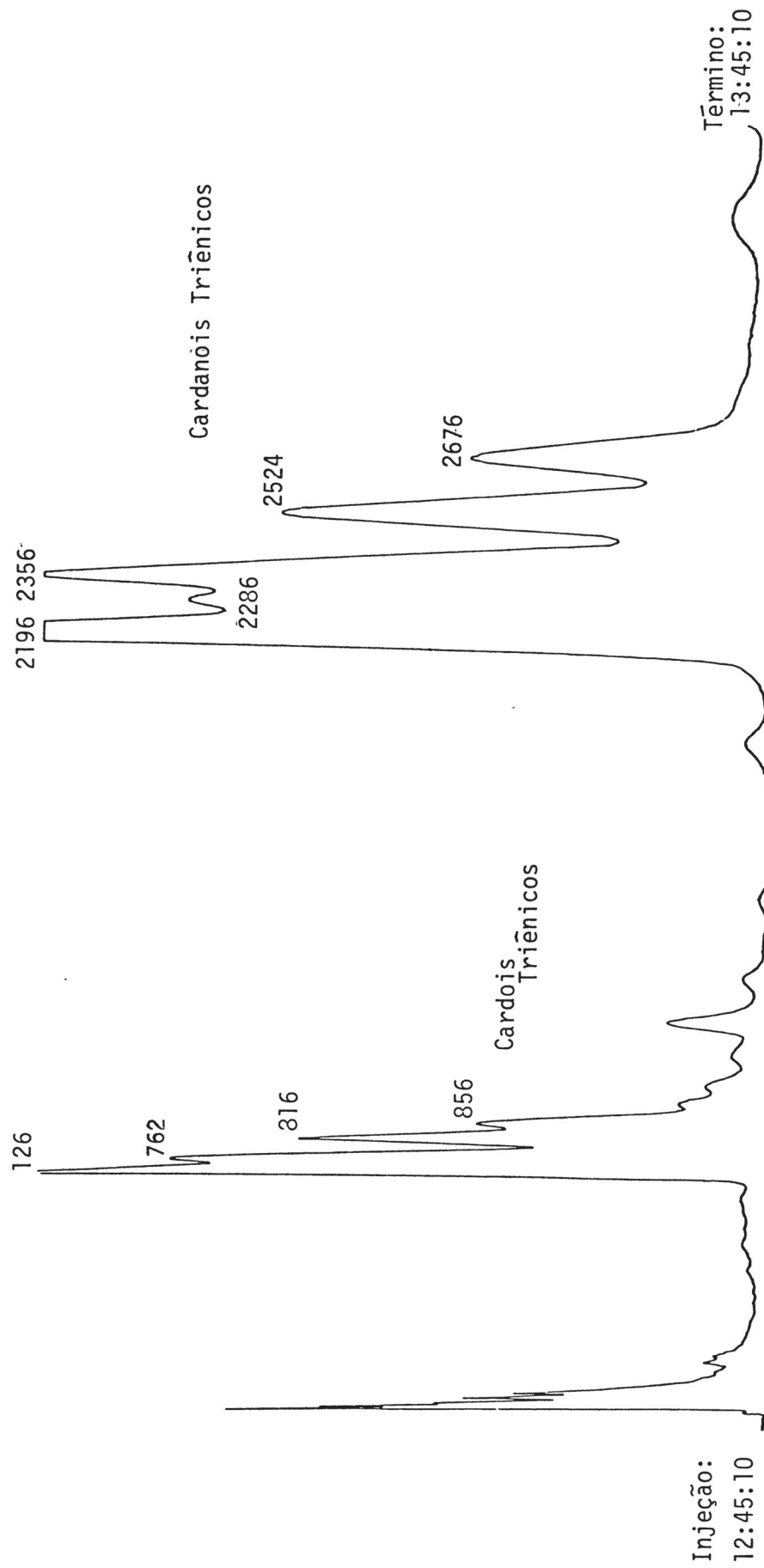
Data: 12/05/83 10:40
Temperatura: 40°C
Coluna: RP-18 (LiChrosorb - 10 μ m)

FIGURA Nº 18: CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO



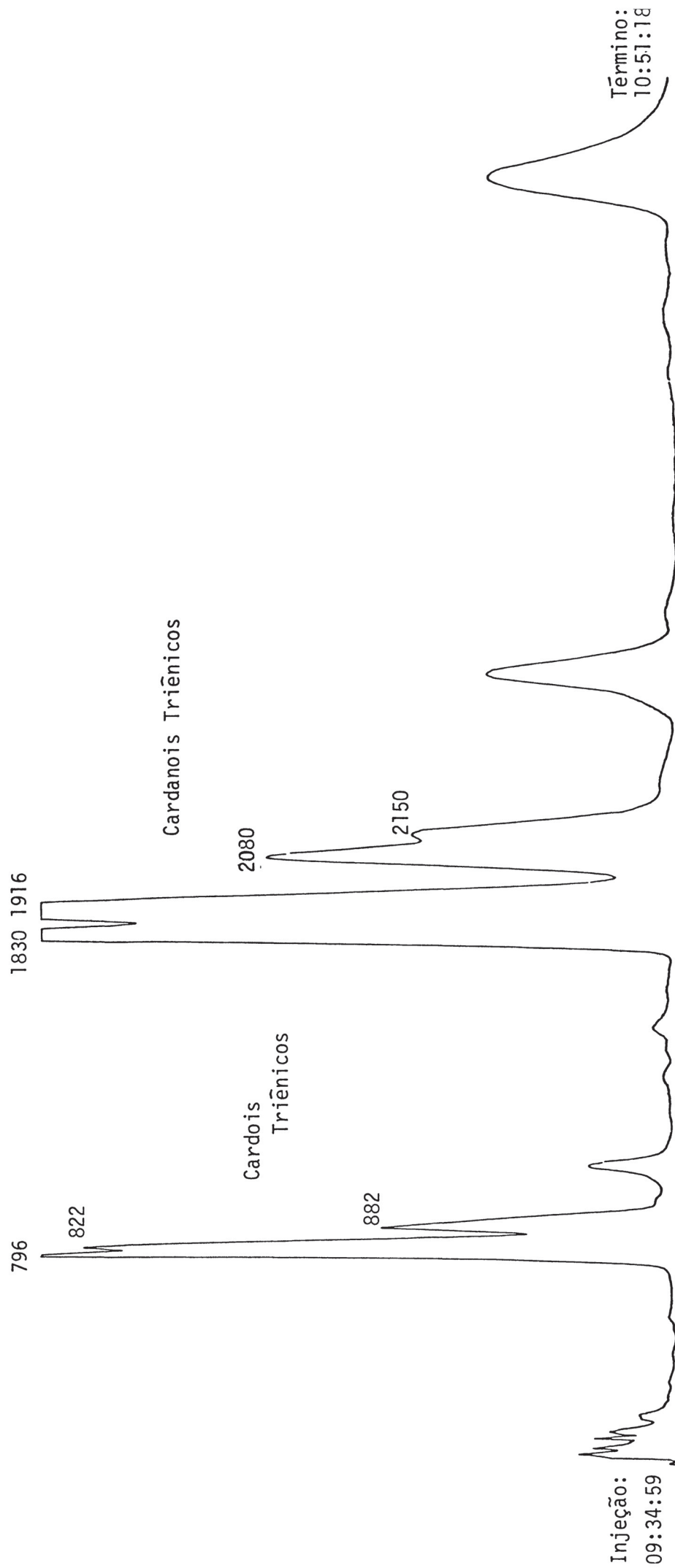
Amostra: OCCC (sobrenadante dissolvido em acetonitrila)
Volume: 10 μ l
Data: 26/04/82 11:28
Vazão: 1,7 ml/min.
Temperatura: 40°C
Pressão: 1355 psi
Coluna: RP-18 (LiChrosorb - 10 μ m)
Detector: UV - 254 nm
Fase Móvel: acetonitrila - água (60 : 40)

FIGURA Nº 19; CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO



Amostra: OCCC (sobrenadante dissolvido em acetoneitrila) Volume: 10µl
 Data: 25/05/82 12:45 Temperatura: 40°C Pressão: 933-psi
 Coluna: RP-18 (LiChrosorb - 10 µm) Detector: UV-254 nm Fase móvel: acetoneitrila-água (60:40)

FIGURA Nº 20: CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO



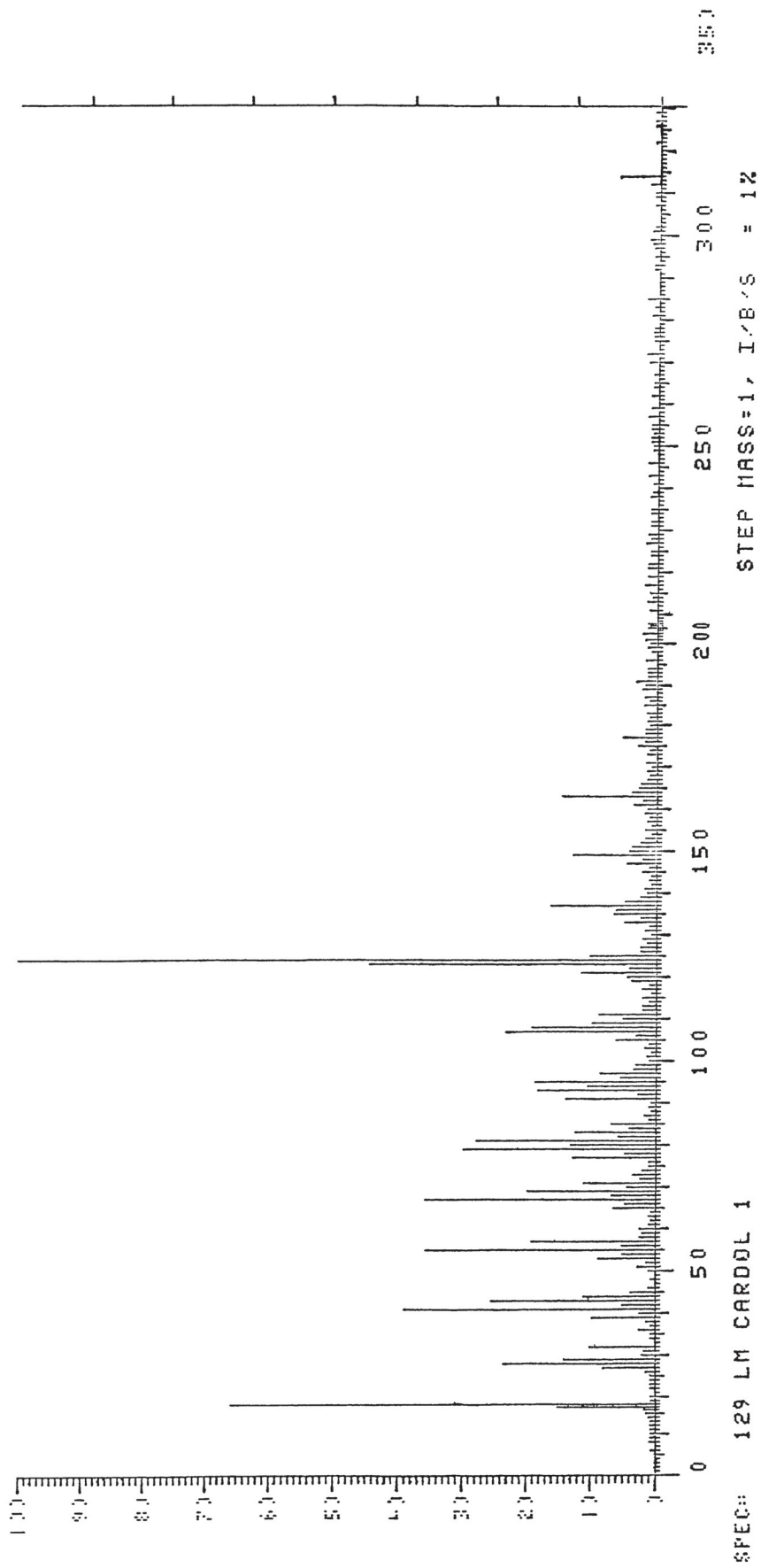
Injeção: 09:34:59

Término: 10:51:18

Amostra: OCCC (Sobrenadante dissolvido em metanol) Volume: 10µl
 Data: 06/05/82 09:34 Vazão: 1,5 ml/min. Temperatura: 40°C
 Coluna: RP-18 (LiChrosorb - 10µm)
 Detector: UV - 254 nm.
 Fase Móvel: Metanol - água (80:20)

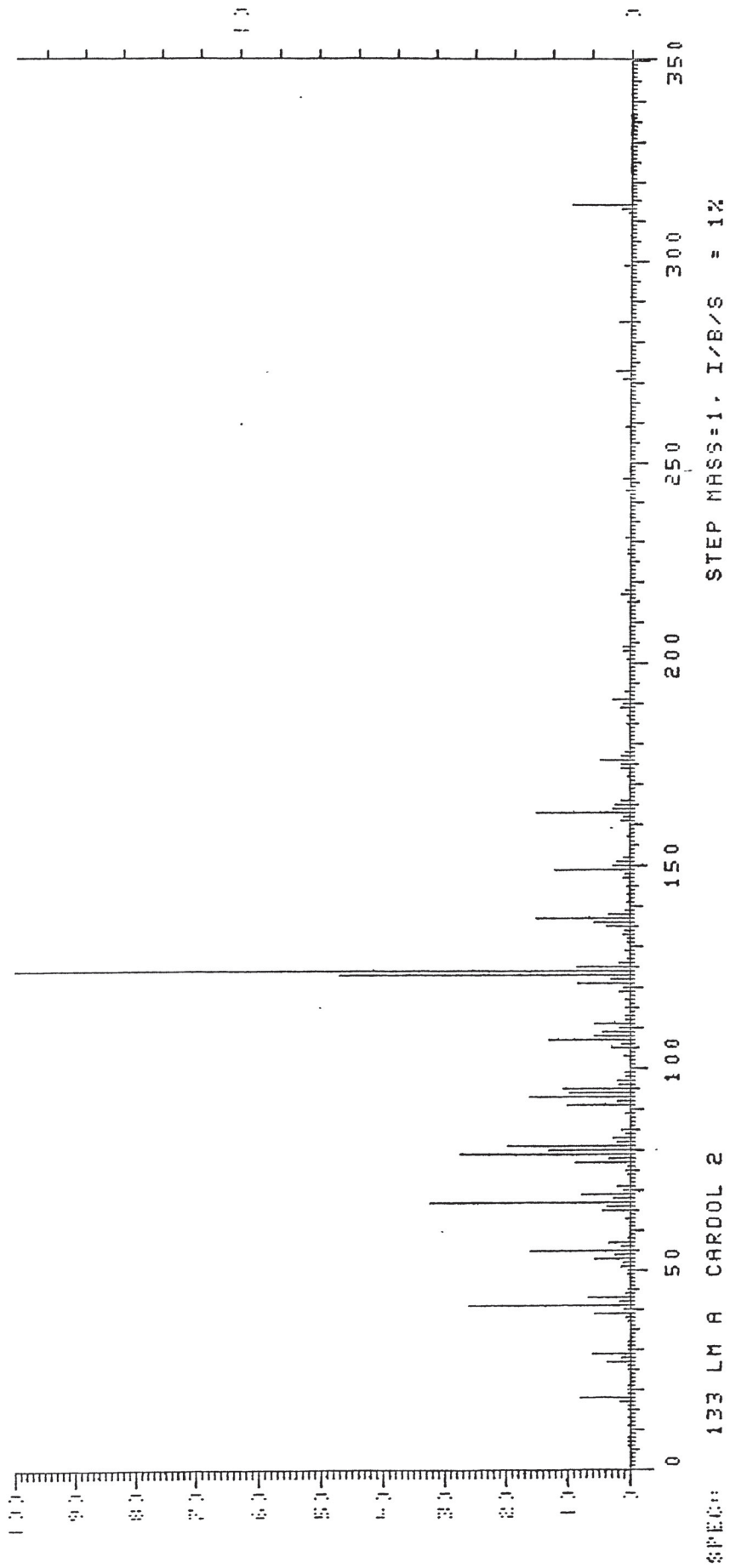
Pressão: 2.209 psi

FIGURA Nº 21: CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO



Energia de ionização: 70 eV

FIGURA Nº 22: ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 1



Energia de ionização: 70 eV

FIGURA Nº 23: ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 2

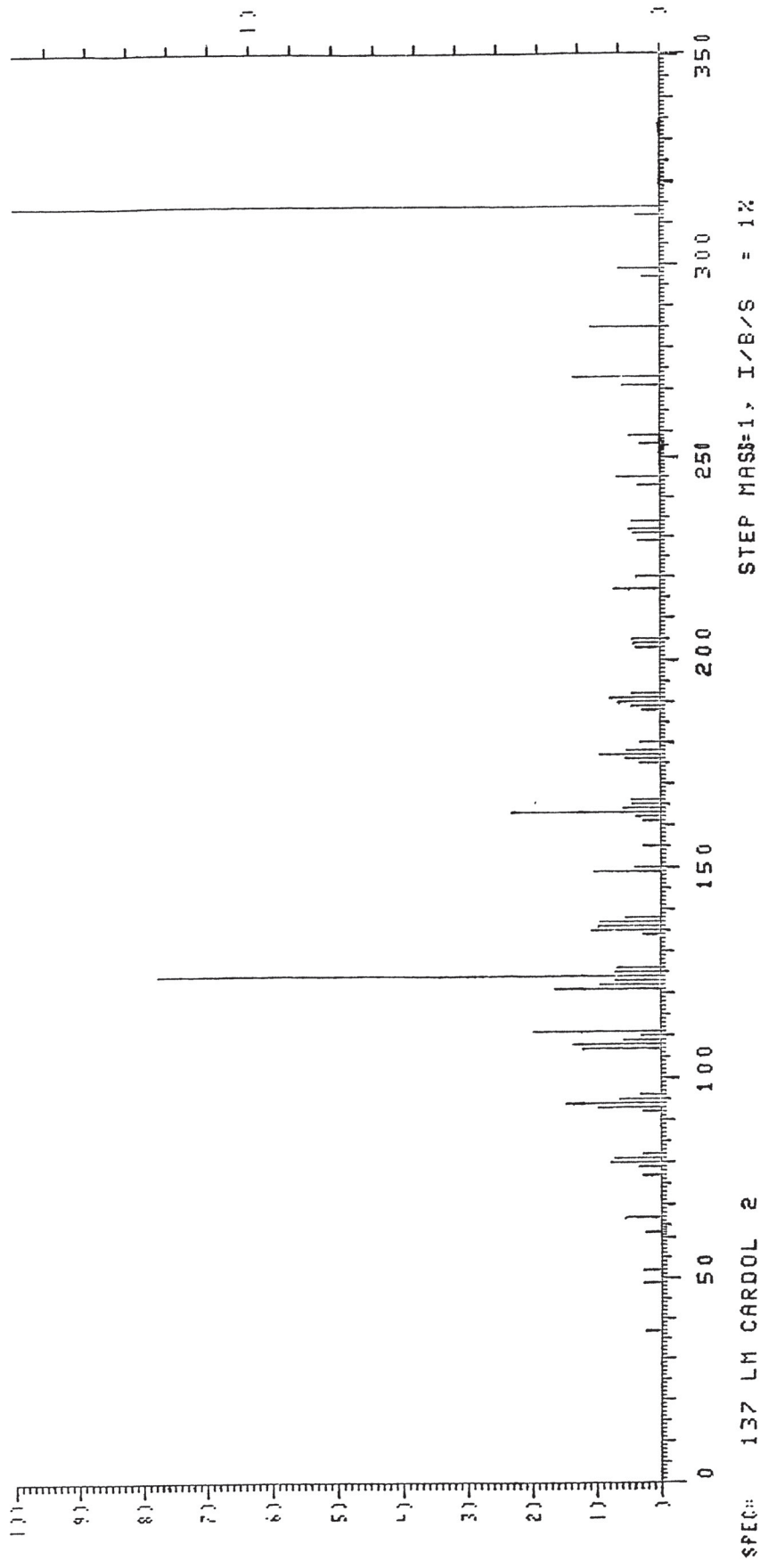
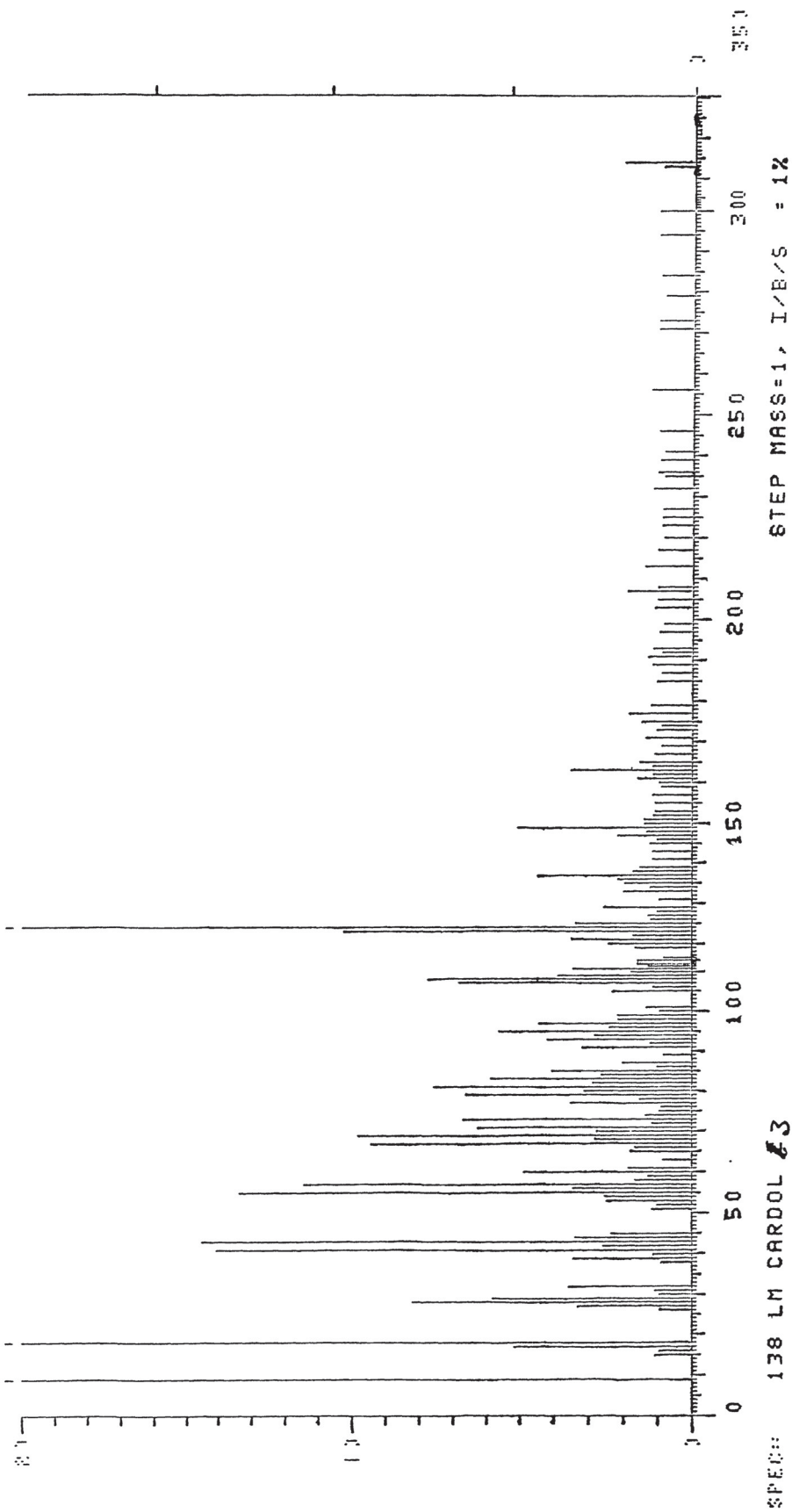


FIGURA Nº 24: ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 2



Energia de ionização: 70 eV

FIGURA Nº 25; ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 3

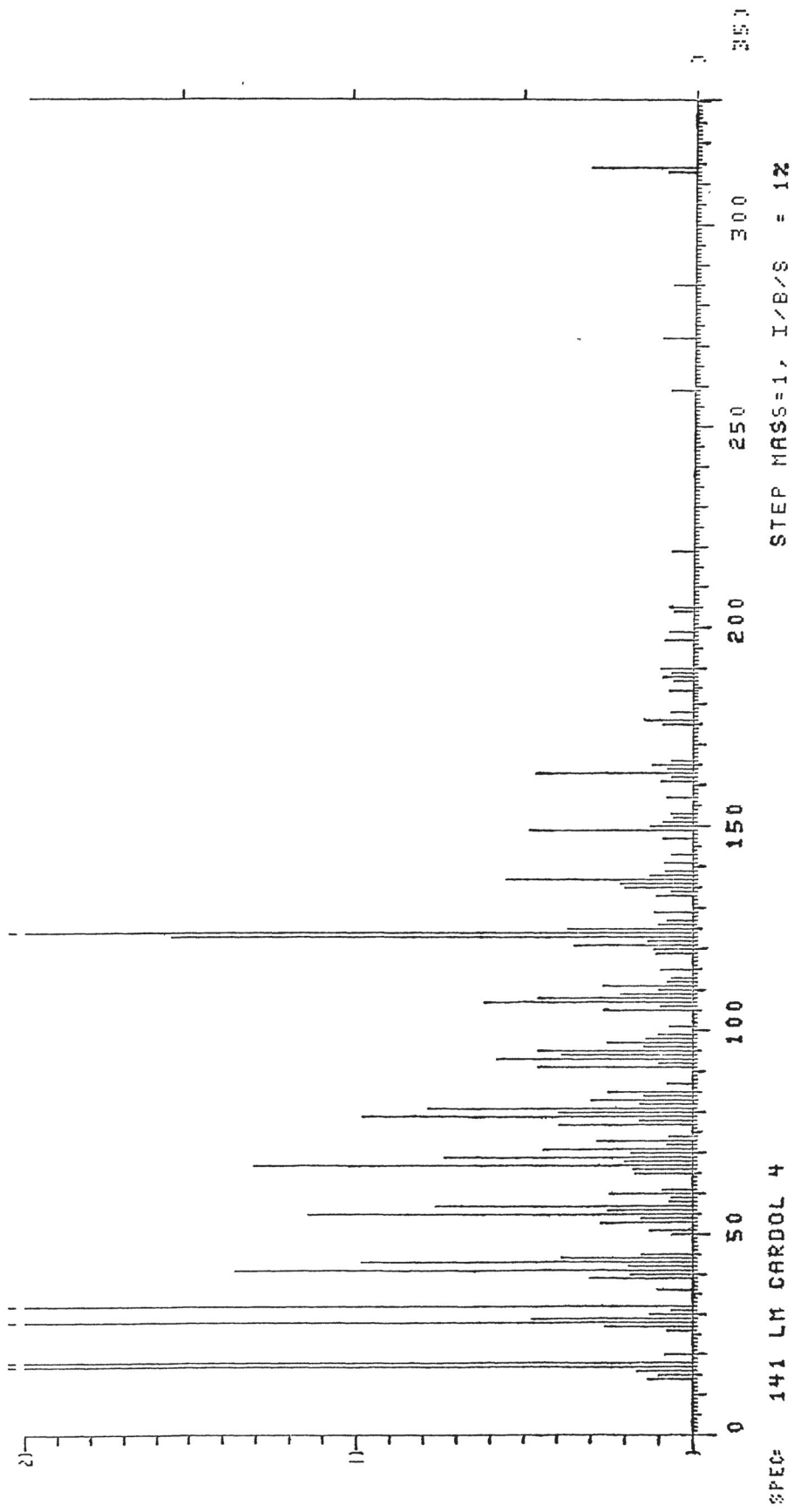
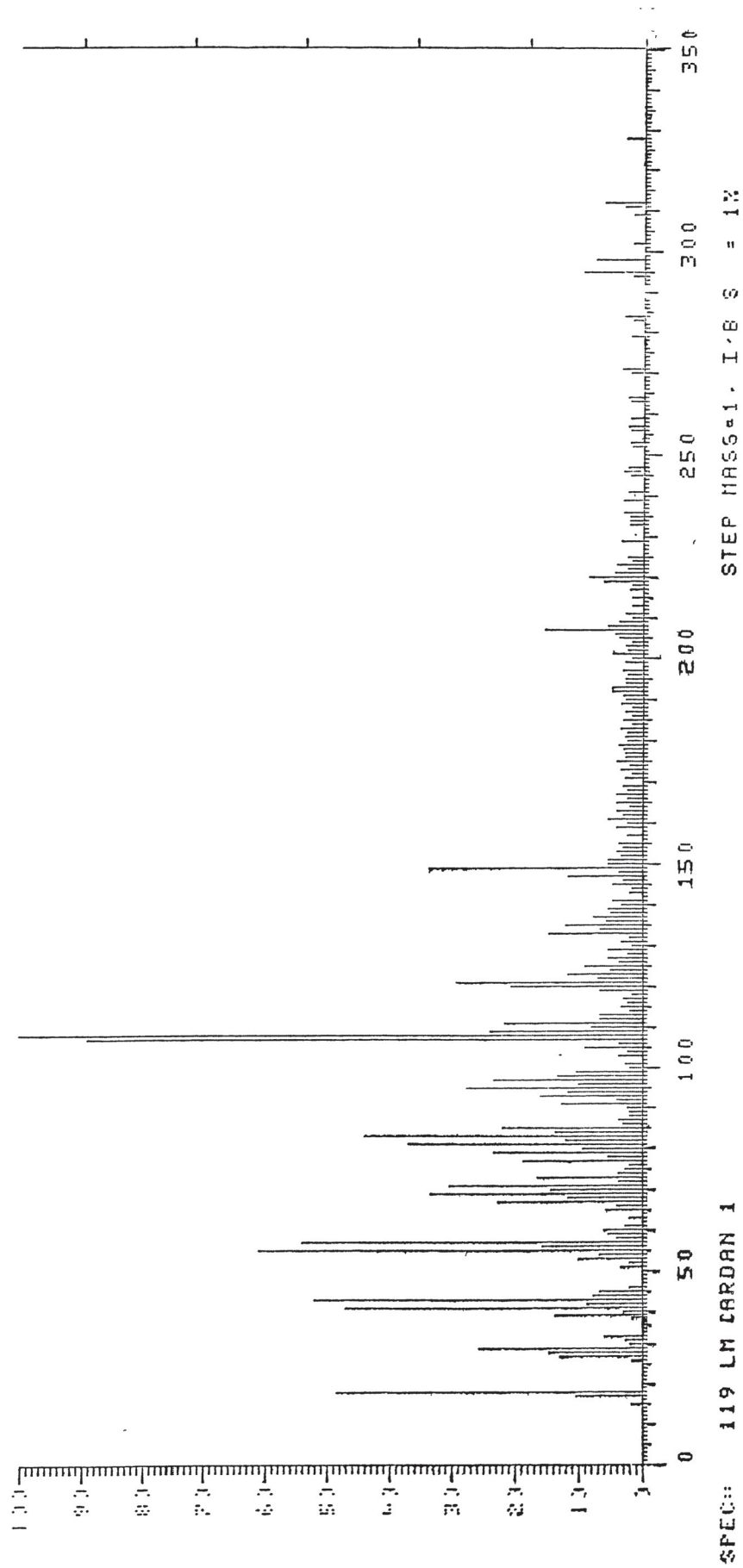
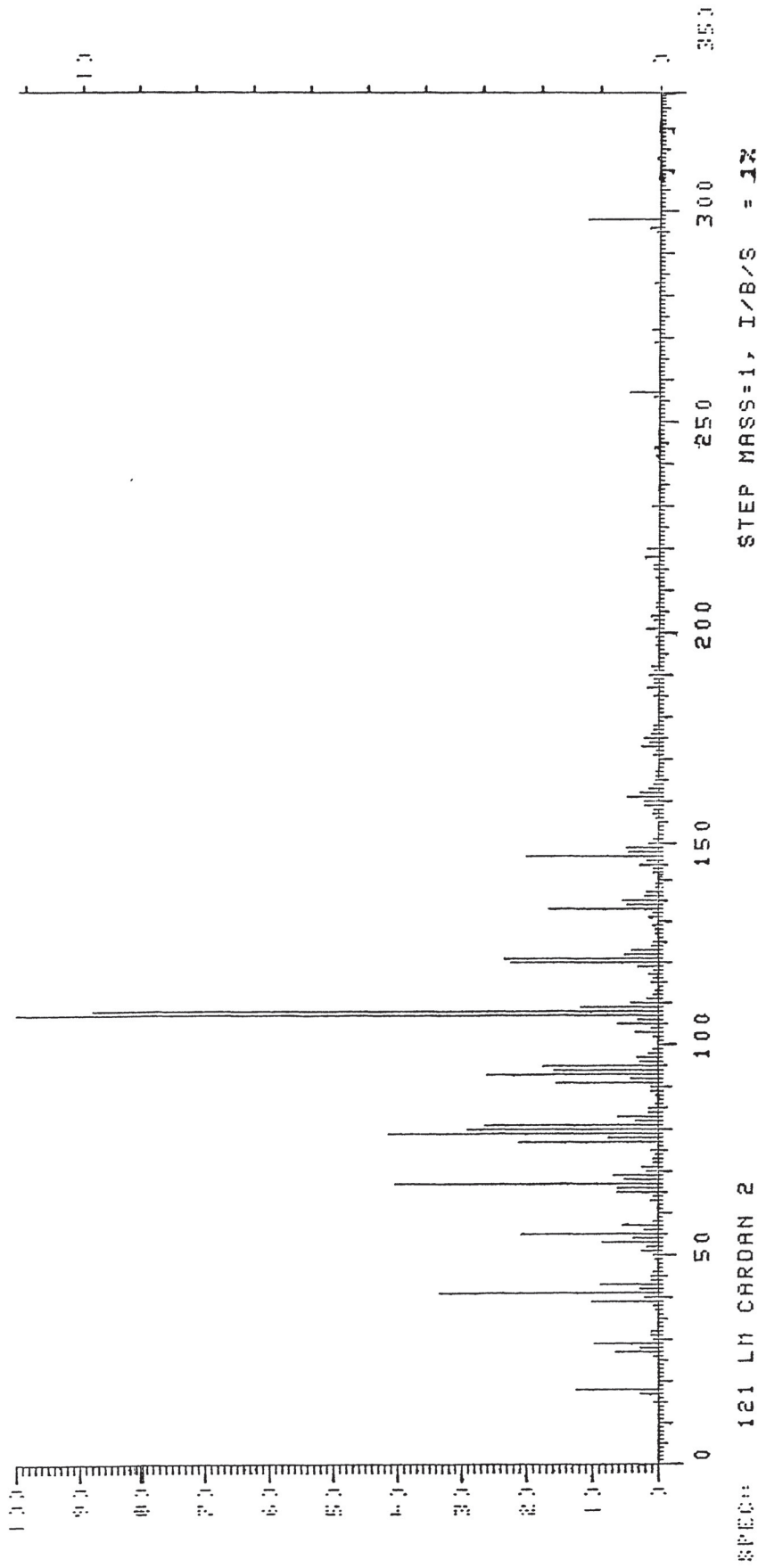


FIGURA Nº 26; ESPECTRO DE MASSA - CARDOL 4



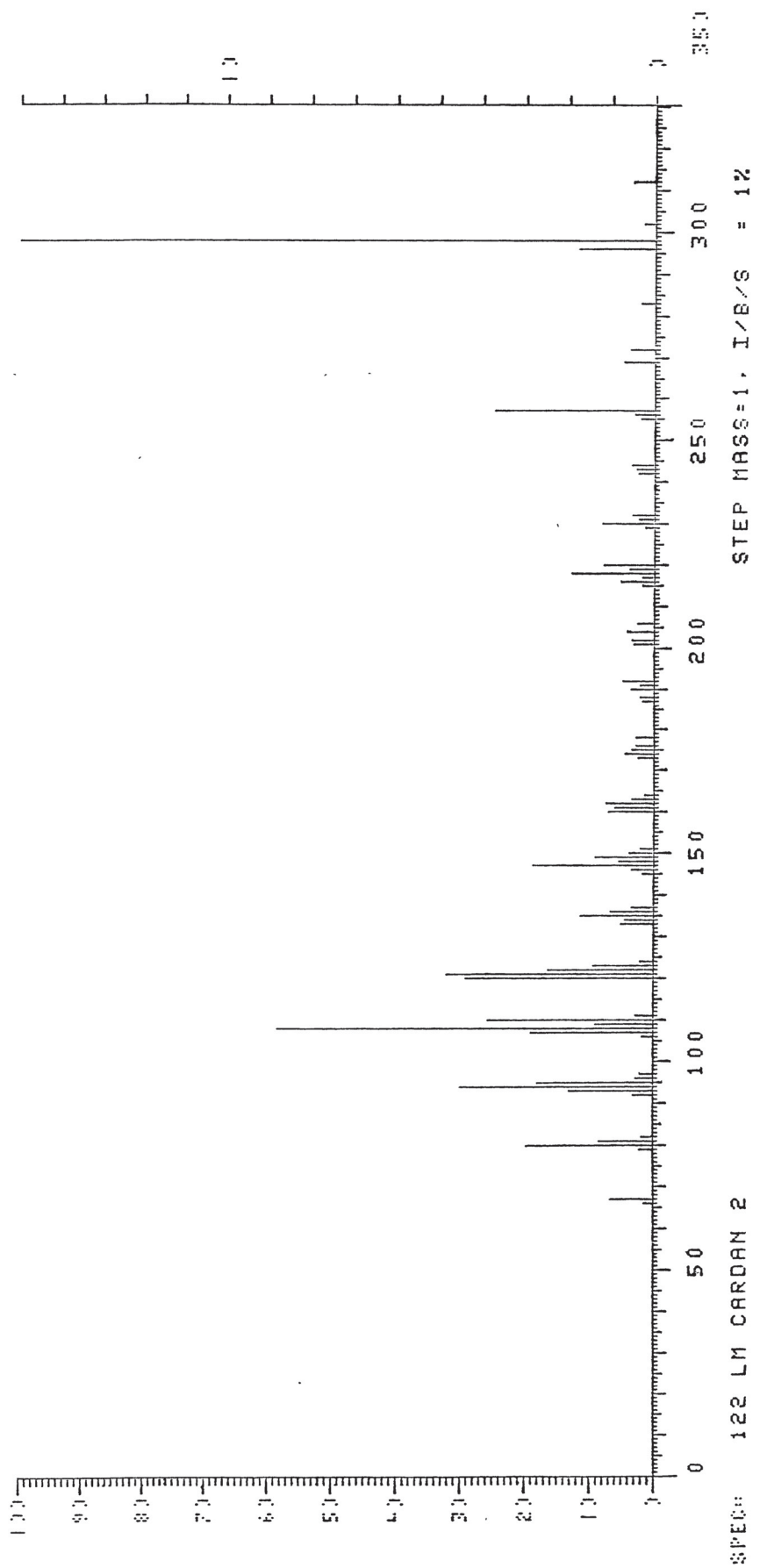
Energia de ionização: 70 eV

FIGURA Nº 27; ESPECTRO DE MASSA - CARDANOL 1



Energia de ionização: 70 eV

FIGURA Nº 28: ESPECTRO DE MASSA - CARDANOL 2



Energia de ionização: 12 eV

FIGURA Nº 29: ESPECTRO DE MASSA - CARDANOL 2

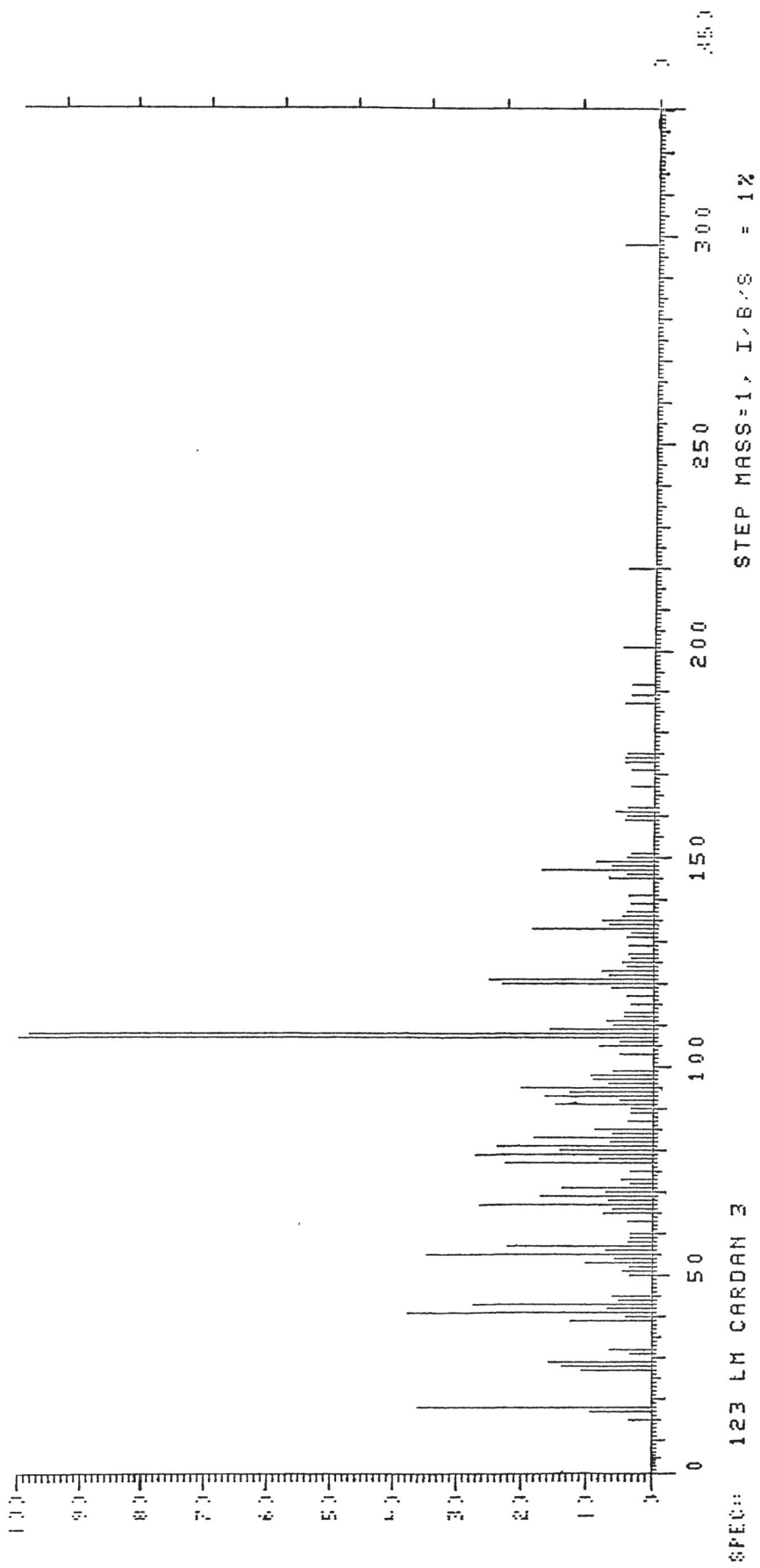


FIGURA Nº 30: ESPECTRO DE MASSA - CARDANOL 3

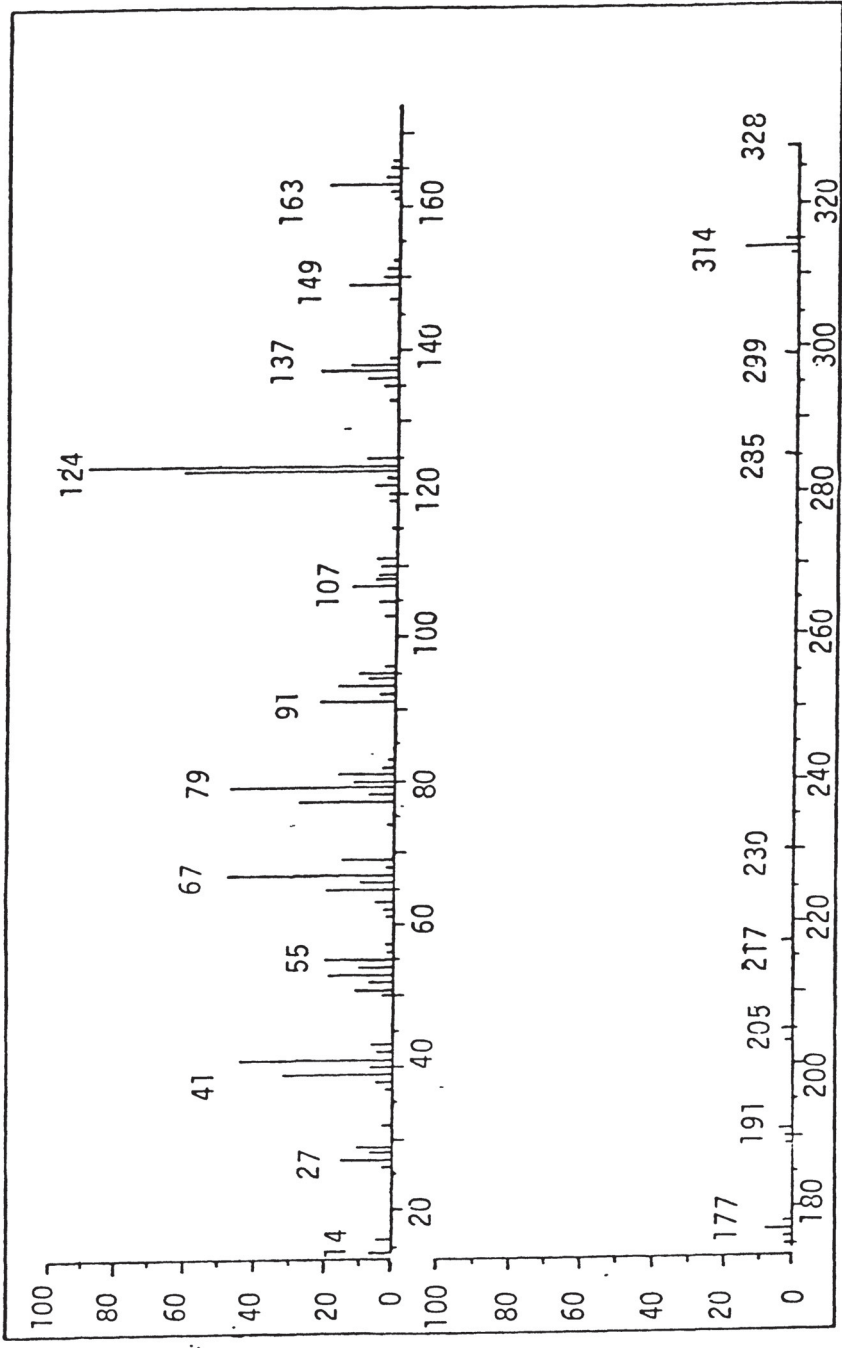


FIGURA Nº 31: ESPECTRO DE MASSA - CARDOL - 2

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. GULATI, A.S. and SUBRA RAO, B.C. Drug analogs from the phenolic constituents of cashew nut shell liquid. *Indian J. Chem.*, **2** (8): 337-338, 1.964
02. NARAYANAMURTI, D. and GEORGE, J. The preservative treatment of hardboards. *Svensk Papperstidn.*, **64** : 667-669, 1.961.
03. GULATI, A.S. KRISHNAMACHAR, V.S. and SUBRA RAO, B. C. Quaternary nitrogen germicides derivad from the monophenolic components of cashew nut shell liquid. *Indian J. Chem.*, **2** (3): 114-118, 1.964.
04. SHIRSALKAR, M.M and SIVASAMBAN, M.A. Coorrosion protection in special environments. *Paintindia.*, **25** (12): 17-20, 1975.
05. RAMALINGAM, T., MURTHY, B.G.K. and SIVASAMBAN, M.A. Cashew nut shell liquid distillation residue. Its utilization in coatings. III. *Paintindia*, **21** (8): 22-24, 1.971.
06. MURTHY, B.G.K. and AGGARWAL, U.S. Cashew nut shell liquid and its use in coatings. *J. Colour Soc.*, **11** (1): 2-5, 1.972.

07. RAMAIIH, M.S. RAMALINGAM, T., MURTHY, B.G.K. and SIVASAMBAN, M.A. Utilization of cashew nut shell liquid and its derivatives in industrial coatings. *J. Colour Soc.* **11** (2): 7-10, 1972.
08. HAYAFUNG, Y. YAMADA, H., YANAGIDA., Y and UEKI, K. Abrasion resistance of paint films. IV. Influence of loaded weight and sanding speed on the abrasion resistance of coatings films. *Shikizai Kyokaiishi*, **48** (11): 659-669, 1.975.
09. ISLAM, M. and BHOWMIK, T. Lac/CNSL (cashew nut shell liquid) combination modified with urea and formalin for coating hessian. *Paintindia*, **22** (2): 19-21, 1.972.
10. TYMAN, J.H.P. Long-Chain phenols. V. Gas chromatographic analysis of cashew nut shell liquid (*Anacardium occidentale*). *J. Chromatogr.* **111**: 285-292, 1.975.
11. TYMAN, J.H.P. Determination of the component phenols in natural and technical cashew nut shell liquid by gas - liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **48** (1): 30-34, 1.976.
12. TYMAN, J.H.P. and JACOBS, N. The composition of the unsaturated phenolic components of anacardic acid. *J. Chromatogr.*, **54**: 83-90, 1.971
13. ROCHA GONSALVES, A.M. d'A e SANTOS COSTA, A.M.B.S.R.C. Chromatography of cashew nut shell liquid. *J. Chromatogra*, **104** (1): 225-227, 1.975.

14. GEDAM, P.H. SAMPATHKUMARAN, P.S. and SIVASAMBAN, M. A.
Examination of components of cashew nut shell liquid by NMR. *Indian J. Chem.*, **10** (4): 388-391, 1.972.
15. TYMAN, J.H.P., TYCHOPOULOS, V. e COLENUTT, B.A. Quantitative analysis of the phenolic lipids in technical cashew nut-shell liquid, from *Anacardium occidentale*, by High performance liquid chromatography. *Chromatogr*, **213**: 287-300, 1.981.
16. TYMAN, J.H.P. Long-chain phenols. IV. Quantitative determination of the composition of the component phenols in cashew nut shell liquid. *J. Chromatogr*, **111** (2): 277-284, 1.975.
17. TYMAN, J.H.P. Long-chain phenols. VIII. Quantitative analysis of the unsaturated constituents of phenolic lipids by thin-layer chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr*, **136**: 289-300, 1977.
18. TYMAN, J.H.P. Long-chain phenols. XIII. Quantitative analysis of the phenolic composition of natural cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) by thin-layer chromatography, densitometry and ultraviolet spectrophotometry. *J. Chromatogr*, **166**: 159-172, 1.978.
19. RIPHAHIV, J. The Lobar pre-packed column as an abundant source of pure water for HPLC. E. Merck, Darmstadt.. Central Analytical Laboratory (AZL) Chromatography Department.

20. CARLSEN, L., EGSEAARD, M., ANDERSEN, J.R. Purification of Acetonitrile. *Anal. Chem*, **51** (9): 1593-1595, 1.975.
21. MORITA, T., ASSUMPÇÃO, R. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. Editora Edgar Blücher Ltda, 1968, 627p.
22. RIDDICK, J.A., BUNGER, W.B. Organic Solvents Wiley - Interscience, 1970. 1041p.
23. TYMAN, J.H.P., MORRIS, L.J. The composition of cashew nut-shell liquid (CNSL) and detection of a novel phenolic ingredient. *J. Chromatogr*, **27**: 287-288, 1967.
24. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley & Sona, Inc. 1979, 863p.