

CONTROLE DE AUTENTICIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA COMERCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO

Valdir F. Veiga Jr.*, Maria Lucia Patitucci e Angelo C. Pinto

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Centro de Tecnologia - Bl. A - Cidade Universitária - Ilha do Fundão - 21949-900 - Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 16/8/96; aceito em 18/6/97

AUTHENTICITY CONTROL OF COMMERCIAL COPAIBA OILS BY HIGH RESOLUTION GAS CHROMATOGRAPHY. Copaiba oil is a resin extracted from the trunk of trees of *Copaifera* species which grow in Brazil where it is widely used in popular medicine as an anti-inflammatory, antiseptic anti-bactericidal, diuretic, dermatological, expectorant, and anti-infective. The comparative study of the composition of commercial copaiba oils was carried out by high resolution gas chromatography (HRGC) and high resolution gas chromatography-mass spectrometry (HRGC-MS) analysis. The commercial oils were compared with authentic oils, collected from the southeast and northern regions of Brazil. Sixteen commercial oils were analysed and two of them revealed adulterations with fatty acids. Using the chromatographic profile of authentic copaiba species oils, it is possible to analyse commercial oils and determine the authenticity of these materials.

Keywords: *Copaifera*; copaiba oil; diterpenes; high resolution gas chromatography.

INTRODUÇÃO

O óleo de copaíba, também descrito como bálsamo de copaíba¹, é extraído do tronco de árvores de diversas espécies do gênero *Copaifera* (Leguminosae). Este gênero ocorre no norte da América do Sul, principalmente nos estados brasileiros do Pará e Amazonas. Os óleos de copaíba são constituídos majoritariamente de hidrocarbonetos sesquiterpênicos² e encontram aplicações na indústria de tintas e vernizes³. Devido ao seu valor comercial são exportados para as indústrias de cosméticos europeias^{4,5}.

No Brasil, os óleos de copaíba são amplamente utilizados na medicina popular^{6,7}, sendo administrados oralmente e por aplicação tópica do óleo *in natura*⁸ ou em pomadas. Nos estados do norte é comum a prática da embrocção do óleo de copaíba para tratar infecções na garganta.

As propriedades anti-inflamatórias dos óleos de copaíba são conhecidas desde o início da colonização do Brasil. Existem descrições de sua utilização por tribos indígenas, que aplicavam-no em umbigos de recém-nascidos para evitar infecções. Pero Magalhães Gandavo, um dos primeiros cronistas da história brasileira, descreve as virtudes do óleo de copaíba como transcritas no texto a seguir⁹:

“Um certo gênero de árvores há também pelo mato dentro da capitania de Pernambuco a que chamam copaibas, de que se tira bálsamo mui salutar e proveitoso ao extremo, para enfermidades de muitas maneiras, principalmente as que precedem a frialdade: causa grandes efeitos, e tira todas as dores por graves que sejam em muito breve espaço. Para feridas ou quaisquer outras chagas, tem a mesma virtude, as quais tanto que com ele lhe acodem, saram mui depressa, e tira os sinais de maneira, que de maravilha se enxergam onde estiveram e nisto se faz vantagem a todas as outras medicinas.”

Os naturalistas e médicos Margrave e Piso¹⁰ que vieram para o Brasil acompanhando João Maurício de Nassau elogiam o óleo de copaíba em sua famosa obra *Historia Naturalis Brasiliae*, como pode ser observado no seguinte trecho:

“Não é dotado somente de admirável virtude mundificante e consolidante, para curar quaisquer feridas por primeira intenção, sarar das mordidas das serpentes e eliminar as cicatrizes, ...

...É bom untar com êle o peito, contra o estômago frouxo; e no ventre, contra as dores de cólicas; gotasinhas convenientemente ingeridas pela boca aumentam a fôrça às visceras e restitui-lhes a vitalidade; também estariam os fluxos femininos, os cursos do ventre e as gonorreias...”

O interesse pela medicina natural vem crescendo em todo o mundo, principalmente na Europa, e artigos recentes demonstram que um percentual muito grande de recursos está envolvido na comercialização de fitoterápicos, que vem tomando o lugar de medicamentos alopáticos nas prateleiras das farmácias, cujo comércio mundial atinge a cifra astronômica de US\$ 12,4 bilhões por ano¹¹. O Brasil não é exceção a esta onda e hoje observa-se um aumento significativo do número de farmácias de produtos naturais nas suas grandes cidades.

O uso crescente de fitoterápicos por grande faixa da população brasileira não vem sendo acompanhado do controle de qualidade dessas drogas vegetais, e muitas vezes até a autenticidade de muitas das plantas usadas é duvidosa. Depois de secas, várias plantas não são facilmente reconhecidas, mesmo por especialistas, devido a semelhanças morfológicas. No caso de óleos o problema é ainda mais grave. Estes, além de poderem sofrer transformações químicas durante o armazenamento, podem ser adulterados com outros óleos inclusive de espécies afins. Por isso é fundamental que se conheça a constituição química de fitoterápicos, a fim de que possam ser desenvolvidos métodos analíticos de controle de qualidade.

Neste trabalho é apresentado o desenvolvimento de uma metodologia que utiliza cromatografia gasosa de alta resolução como ferramenta básica de análise para o controle de qualidade de óleos de copaíba. Estes óleos têm mostrado atividade anti-inflamatória¹² através de bioensaios *in vivo*.

PARTE EXPERIMENTAL

Nas análises realizadas por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM) as amostras foram esterificadas com diazometano para derivatização dos ácidos carboxílicos aos seus ésteres metílicos correspondentes.

As amostras de óleo autêntico de copaíba foram coletadas diretamente das árvores, através de incisões no tronco com

trado. Os óleos de *Copaifera multijuga*, conhecida popularmente como Copaíba Branca, foram coletados com intervalo de seis meses de uma espécie localizada na Reserva Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), na região de Manaus, no estado do Amazonas. Dois óleos foram obtidos de espécimes de *Copaifera langsdorfii*¹⁹, conhecida popularmente como Copaíba Vermelha, que foram coletados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Um outro óleo foi coletado em Manaus, nas proximidades da Reserva Ducke, (chamado *Copaifera sp.* AM) e o outros dois foram cedidos pelo professor Miguel Fascio do Instituto de Química da UFBA que os coletou de um mesmo espécime em diferentes épocas do ano (*Copaifera sp.* BA I e II) no interior da Bahia. Analisou-se ainda um óleo de copaíba adquirido no Cima's Horto Medicinal na cidade de São Lourenço, MG, que não objetiva lucros financeiros, sendo este óleo denominado *Copaifera sp.* MG.

Os dezesseis óleos de copaíba comerciais foram adquiridos em mercados e em farmácias naturais dos estados do Amazonas, Pará, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná.

As análises dos óleos por CGAR foram realizadas em cromatógrafo HP-5790 equipado com detector de ionização de chama (FID) e módulo de injeção com razão de divisão (split) de 1:20. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 2 mL min⁻¹.

A programação da temperatura do forno foi de uma isoterma inicial de dois minutos a 110°C seguida de taxa de 3°C min⁻¹ até 130°C e nova taxa de 8,5°C min⁻¹ até 290°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 270°C e 300°C, respectivamente.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em espectrômetro de massas HP-5897A conectado a cromatógrafo HP-5880. Os espectros de massas foram obtidos através de impacto de elétrons, na faixa entre 40 e 600 u.m.a. utilizando 70 eV, com analisador quadrupolo.

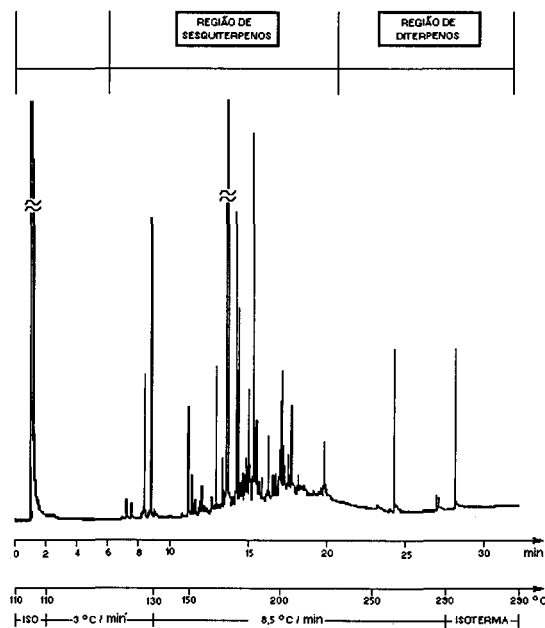
Em todas as análises foi utilizada coluna capilar de vidro de fase SE-54 (5% fenil, 1% vinil em metilsilicone) de 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

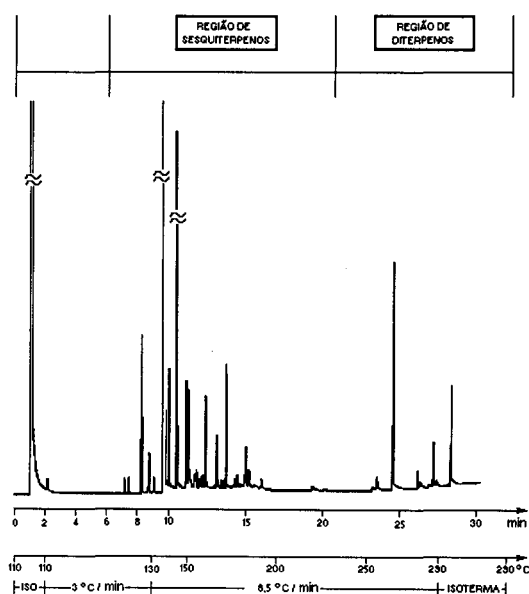
Inicialmente foram analisados os dois óleos autênticos de *Copaifera multijuga* (cromatogramas 1 e 2), obtidos de uma mesma espécie. Estes óleos passaram a servir como referência. A análise cromatográfica destes óleos, após esterificação com diazometano, levou a determinação de duas regiões de eluição específicas, de acordo com dados da literatura¹³. A primeira região de eluição, a de menor tempo de retenção, apresentou grande sobreposição de picos, correspondente a hidrocarbonetos sesquiterpênicos e foi chamada de Região de Sesquiterpenos. A segunda região corresponde a região de eluição dos ésteres metílicos de ácidos diterpênicos e foi chamada de Região de Diterpenos. Tanto os pesos moleculares dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos como dos ésteres metílicos diterpênicos foram confirmados através dos seus respectivos íons moleculares por CGAR-EM.

Após as análises cromatográficas dos óleos de referência, quando foram determinadas as melhores condições cromatográficas de separação, analisou-se os óleos de copaíba comerciais.

O perfil dos cromatogramas dos óleos comerciais e dos óleos de referência permite que se observe adulterações grosseiras. Quando se analisou o óleo de copaíba comercial n° 3 (cromatograma 3) não foram observadas as duas regiões de retenção características dos óleos de copaíba de referência, sugerindo uma adulteração do óleo. No entanto, uma análise acurada para confirmar se um determinado componente está ou não presente no óleo deve ser feita com mais rigor do que uma simples comparação visual para que não se incorra em erro de interpretação. Neste caso, no entanto, os espectros de massas (CGAR-EM) mostraram que tratava-se de uma série homóloga



Cromatograma 1. *Copaifera multijuga I.*

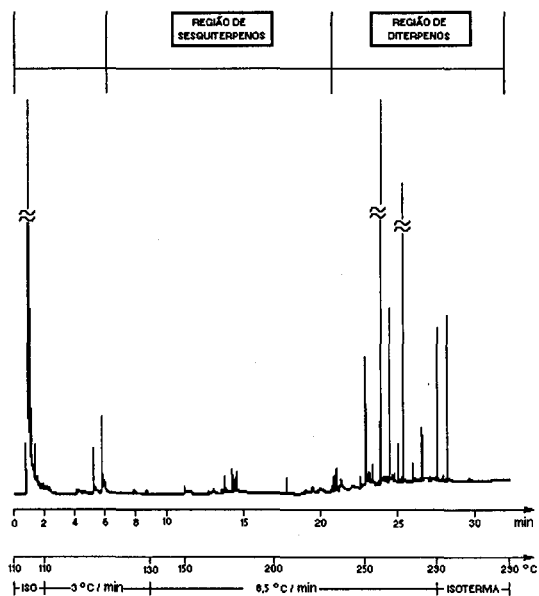


Cromatograma 2. *Copaifera multijuga II.*

de ésteres metílicos de ácidos graxos, que são reconhecidos através dos fragmentos de m/z 74 e de m/z 87.

Como pode ser visto nos cromatogramas 1 e 2 referentes aos óleos de copaíba de referência, a região de eluição dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos é muito congestionada. O grande número de picos dificulta qualquer análise comparativa. Por isto procurou-se trabalhar com a fração contendo os diterpenos ácidos, que foram obtidos usando-se a metodologia que foi desenvolvida num trabalho anterior para a determinação da composição química de *Copaifera cearensis*¹⁴. Assim, os óleos de copaíba foram fracionados em coluna de gel de sílica impregnada com hidróxido de potássio, em três frações. A primeira constituída de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, a segunda de hidrocarbonetos sesquiterpênicos oxigenados, e a terceira de ácidos diterpênicos.

A fração de diterpenos ácidos foi metilada com diazometano e analisada por CGAR-EM. Todo o estudo de certificação dos



Cromatograma 3. Óleo de copaíba comercial n° 3.

óleos de copaíba estudados foi feito com base nas frações contendo ácidos carboxílicos diterpênicos.

O quadro 1 apresenta os óleos adquiridos no comércio, com sua respectiva procedência e número de diterpenos detectados por espectrometria de massas.

Quadro 1. Número de diterpenos detectados nos óleos de copaíbas comerciais.

Número do óleo comercial	Número de diterpenos detectados	Origem
1	12	Belém - PA
2	9	Manaus - AM
3	7	Rio de Janeiro - RJ
4	16	Rio de Janeiro - RJ
5	4	Rio de Janeiro - RJ
6	10	São Paulo - SP
7	11	Rio de Janeiro - RJ
8	11	Manaus - AM
9	4	Manaus - AM
10	7	Manaus - AM
11	23	Santarém - PA
12	11	Teresópolis - RJ
13	10	São Lourenço - MG
14	8	Rio de Janeiro - RJ
15	14	Belém - PA
16	27	Colombo - PR

Os principais esqueletos de diterpenos observados foram labdano, caurano e clerodano. A figura 1 mostra as estruturas dos diterpenos mais comumente detectados por espectrometria de massas de cada esqueleto. O ácido copálico¹⁵ foi encontrado em todos os óleos de copaíba estudados, o ácido hardwickiico, em 42% dos óleos, já descrito no gênero *Copaifera*¹⁶ e o ácido caurenóico¹⁷ encontrado em cerca de 30 % destes, que está descrito na literatura contendo atividade anti-microbiana¹⁸. A figura 2 mostra o espectro de massas do éster metílico do ácido hardwickiico.

Análise dos cromatogramas dos óleos comerciais adquiridos numa mesma praça comercial, por exemplo as amostras dos óleos n°s 3, 4 e 5 e de n°s 9, 10 e 11, mostram de 4 a 16 e de

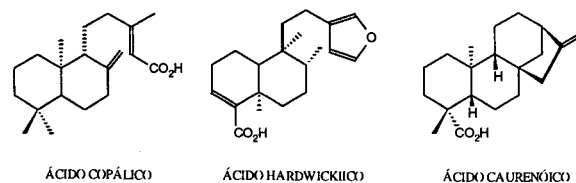


Figura 1. Principais diterpenos detectados nos óleos de copaíba.

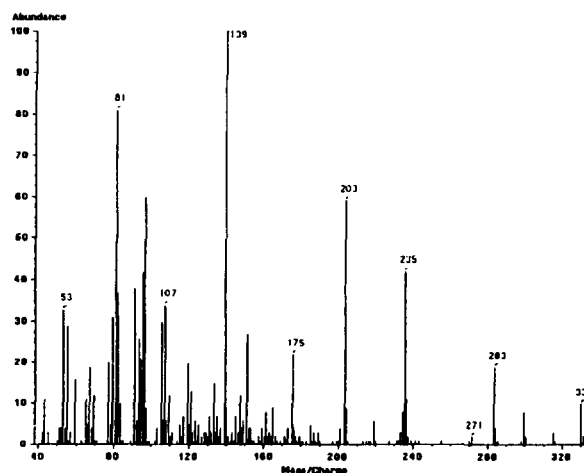


Figura 2. Espectros de Massas (Impacto de Elétrons) do éster metílico do ácido hardwickiico.

4 a 23 diterpenos, respectivamente. A análise do cromatograma 4 do óleo de copaíba comercial n° 4 revelou a presença de 16 diterpenos. Nestes casos observa-se uma variação significativa do número de diterpenos pressupondo claramente que deve estar ocorrendo a comercialização, em alguns casos, de uma mistura de óleos de copaíba de mais de uma espécie.

Afim de confirmar esta observação, a princípio muito simplista, e para dispormos de mais elementos para sustentar esta quase afirmação, analisamos mais seis óleos autênticos de copaíba.

Analisando os cromatogramas destes seis óleos de copaíba observamos a presença de 3 a 9 diterpenos. Como pode ser observado nestes seis casos o número de diterpenos não ultrapassa de 9, o que vem corroborar a tese inicial de que muitos dos óleos comerciais são misturas de várias espécies.

O quadro 2 apresenta os óleos de copaíba autênticos, obtidos de espécies botânicas identificadas, com sua respectiva procedência e número de diterpenos detectados por espectrometria de massas.

As análises dos óleos de *Copaifera multijuga* coletados nos meses de agosto e janeiro mostraram a ocorrência de uma variação na concentração de alguns diterpenos, indicando a possibilidade de que haja variação sazonal nestes óleos. Observamos em outro caso que quando analisamos o mesmo óleo de copaíba ao longo do tempo, quando este é deixado exposto à luz solar sobre a bancada do laboratório em vidro transparente, o sesquiterpeno cariofileno²⁰ se transforma em óxido de cariofileno²¹.

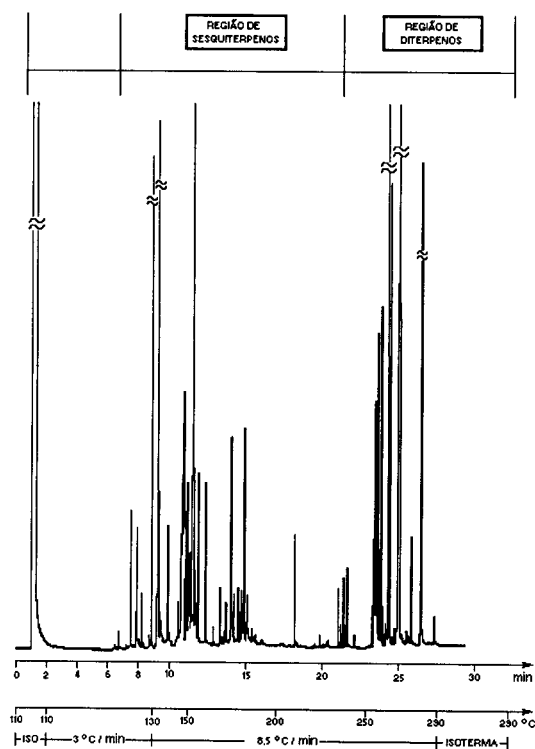
CONCLUSÕES

Na análise por CGAR-EM observou-se que o ácido copálico foi o único composto a ser detectado em todos os óleos estudados indicando que este diterpeno pode ser utilizado como biomarcador para o gênero *Copaifera*.

A atividade anti-microbiana atribuída ao óleo de copaíba pode ser justificada pela presença de ácido caurenóico, também detectado através de CGAR-EM em alguns dos óleos estudados.

Quadro 2. Número de diterpenos detectados nos óleos de copaíba autênticos.

Óleos autênticos	Número de diterpenos detectados	Local de Coleta
<i>Copaifera multijuga</i> I	4	Reserva Ducke - Manaus-AM
<i>Copaifera multijuga</i> II	6	Reserva Ducke - Manaus-AM
<i>Copaifera</i> sp. BA I	5	Interior da Bahia
<i>Copaifera</i> sp. BA II	5	Interior da Bahia
<i>Copaifera</i> sp. MG	7	São Lourenço - MG
<i>Copaifera</i> sp. AM	3	Reserva Ducke - Manaus-AM
<i>Copaifera langsdorf</i> 1	9	Jardim Botânico do Rio de Janeiro - RJ
<i>Copaifera langsdorf</i> 2	7	Jardim Botânico do Rio de Janeiro - RJ

**Cromatograma 4.** Oleo de copaíba comercial n° 4.

Nos dezesseis óleos comerciais estudados através de seus respectivos espectros de massas foram detectados mais de sessenta diferentes ácidos carboxílicos diterpênicos.

O grande número de diterpenos encontrados nos óleos comerciais nos leva à conclusão de que estes são, em grande parte, misturas de diferentes óleos de copaíba autênticos, visto que nos óleos de copaíba autênticos o número máximo de diterpenos detectados foi nove.

A presença de ácidos carboxílicos lineares (C_{14} a C_{18}) em alguns óleos comerciais analisados (n°s 3 e 5) é indicativo de adulteração, possivelmente por óleo de soja.

A comercialização de fitoterápicos exige dos Conselhos Federal e Regionais de Farmácia uma vigilância constante, a bem de salvaguardar a saúde da população. Os óleos de copaíba comerciais deveriam trazer no rótulo o nome da espécie botânica e a data e local de coleta do óleo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro, ao LADETEC do Instituto de Química da UFRJ, ao Prof. Miguel Fascio do Instituto de Química da UFBA, ao Dr. Simon Garden e ao Professor Ricardo Bicca de Alencastro do Instituto de Química da UFRJ e ao CNPq pela bolsa de mestrado de V. F. V. Jr..

REFERÊNCIAS

1. Deussen, E.; *Scientia Pharm* **1939**, *10*, 69.
2. Wenninger, J. A.; Yates, R. L.; Dolinsky, M.; *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* **1967**, *50*, 1304.
3. Wakao, Y.; Bras. Pedido PI 7803, 792, (1978).
4. Freise, F. W.; *Süddeutsche Apotheker-Ztg.* **1937**, *77*, 11.
5. Del Nunzio, M. J.; *Aerosol Cosmet.*, **1985**, *7*, 7.
6. Fernandes, R. M.; Pereira, N. A.; Paulo, L. G.; *Rev. Bras. Farm* **1992**, *73*, 53.
7. Opdyke, D. L. J.; *Food Cosmet. Toxicol.* **1976**, *14 Suppl. II*, 687.
8. Basile, A. C.; Sertié, J. A. A.; Freitas, P. C. D.; Zanini, A. C.; *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *22*, 101.
9. Vogt, C. e Lemos, J. A. G.; *Cronistas e Viajantes*, Abril Educação, São Paulo, 1982.
10. Marcgrave, J.; *Historia Natural do Brasil*, 1942, Imprensa Oficial do Estado, São Paulo.
11. Sears, C.; *New Sci.* **1995**, *2002*, 35.
12. Pinto, A. C.; Calixto, J. B.; Veiga Jr., V. F.; Patitucci, M. L.; resultados não publicados.
13. Veiga Jr, V. F.; Patitucci, M. L.; Pinto, A. C.; Rocha, J.; Zoghbi, M. G. B.; *Quím. Nova* **1995**, *18*, 262.
14. Pinto, A. C.; Braga, W.; resultados não publicados.
15. Djerassi, C.; Nakano, T.; *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 167.
16. Cocker, W.; Moore, A. L.; Prait, A. C.; *Tetrahedron Lett.* **1965**, *24*, 1983.
17. Nakano, T.; Usubillaga, A.; *Planta Medica* **1969**, *35*, 331.
18. Alves, T. M. A.; Chaves, P. P. G.; Santos, L. M. S. T.; Nagem, T. J.; Murta, S. M. F.; Ceravolo, I. P.; Romanha, A. J.; Zani, C. L.; *Planta Medica* **1995**, *61*, 85.
19. Pio Corrêa, M.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Ministério da Agricultura - Rio de Janeiro, 1931, pg. 373.
20. Langenheim, J. H.; Nascimento, J. C.; *Biochem. Syst. and Ecol.* **1986**, *14*, 615.
21. Arrhenius, S. P.; Langenheim, J. H.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 471.