

ESTUDO DA AUTENTICIDADE DE ÓLEOS-RESINA DE COPAÍBA COMERCIAIS UTILIZANDO MÉTODOS ANALÍTICOS CONVENCIONAIS

Deisiane Aparecida da Silva (IC), (Universidade Tecnológica Federal do Paraná),
kdeisi_kontigo@hotmail.com
Paulo Mitsuo Imamura, (Universidade Estadual de Campinas), imam@iqm.unicamp.br
Adriano Lopes Romero (OR), (Universidade Tecnológica Federal do Paraná),
adrianoromero@utfpr.edu.br

RESUMO: O óleo-resina de copaíba é conhecido desde o início da colonização do Brasil e continua sendo amplamente utilizado na medicina popular como cicatrizante, anti-inflamatório das vias urinárias, em infecções pulmonares, antisséptico, antitumoral, e como agente para tratar doenças de pele, entre outras. No entanto, ainda hoje, este produto natural não vem sendo submetido a um adequado controle de qualidade. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a autenticidade de óleos-resina de copaíba comerciais utilizando métodos analíticos convencionais e comparação com dados de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear. Após a realização de vários métodos analíticos convencionais, observou-se contradição entre os mesmos. Os dados de índices de acidez e de éster indicavam que todas as amostras estavam adulteradas com óleo graxo. No entanto, ao estudar o perfil cromatográfico, em CCD, para nenhuma amostra de óleo-resina de copaíba observou-se manchas características de ésteres graxos. Esses dados foram comprovados por CG-EM, onde não observou-se nenhum composto com espectro de massas característicos de ésteres graxos. Conclui-se que a utilização de um único método para verificar a adulteração de óleos-resina de copaíba é uma prática inviável devido a grande diversidade química que este produto natural apresenta.

PALAVRAS-CHAVE: *Copaifera spp.*; óleo-resina; controle de qualidade.

INTRODUÇÃO

O óleo-resina de copaíba é um produto natural extraído por meio de incisões ou perfurações no caule de árvores do gênero *Copaifera*. Este produto natural é conhecido desde o início da colonização do Brasil e continua sendo amplamente utilizado na medicina popular como cicatrizante, anti-inflamatório das vias urinárias, em infecções pulmonares (tosses, bronquites, gripes e resfriados), antisséptico, antitumoral, e como agente para tratar doenças de pele, nas úlceras (STILLÉ, 1860; PARKER, 1854; FLEURY, 1997; VEIGA JR. & PINTO, 2002; ROMERO, 2007). Dos Índios, veio o costume sertanejo de aplicá-lo no corte do umbigo dos recém-nascidos, para evitar as afecções tetânicas, conhecidas popularmente por mal de 7 dias (BRAGA, 1960).

Quimicamente, o óleo-resina de copaíba pode ser definido como uma solução de ácidos diterpênicos em um óleo essencial constituído majoritariamente por sesquiterpenos (CASCON & GILBERT, 2005; ROMERO, 2007). Do ponto de vista biológico, é um produto de excreção ou desintoxicação do organismo vegetal, e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e

bactérias (VEIGA JR. & PINTO, 2002; ROMERO, 2007). Segundo dados da literatura (LEANDRO, 2012; VEIGA JR. & PINTO, 2002; ROMERO, 2007), foram descritos em óleos-resina de copaíba cerca de cem sesquiterpenos e trinta e sete diterpenos, desconsiderando duplicidades ocasionadas devido ao uso de nomes IUPAC e usual. Vários desses compostos tiveram suas atividades biológicas e/ou farmacológicas comprovadas cientificamente, tais como a atividade antiinflamatória e inseticida do β -cariofileno, atividade antifúngica do óxido de cariofileno, atividade antitumoral do ácido hardwickiico, atividade antitripanossômica do ácido copálico, entre outras (LEANDRO, 2012; VEIGA JR. & PINTO, 2002).

Apesar de todas as atividades biológicas e farmacológicas associadas aos óleos-resina de copaíba, ainda hoje, este produto natural não vem sendo submetido a um adequado controle de qualidade. Uma adulteração comum do óleo-resina de copaíba é adicionar produtos de menor valor agregado, com o objetivo de diluição. Muitos intermediários na comercialização do óleo-resina de copaíba, assim como alguns laboratórios farmacêuticos, misturam álcool, óleo diesel, óleo vegetal comestível e banha animal para a diluição deste produto natural (VEIGA JR. & PINTO, 2002).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a autenticidades de óleos-resina de copaíba comerciais utilizando métodos analíticos convencionais e comparação com dados de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear.

PARTE EXPERIENTAL

Amostras de óleo de copaíba

Neste trabalho utilizou-se três amostras de óleo-resina de copaíba e uma de bálsamo de copaíba adquiridos de empresas que comercializam estes produtos naturais nacionalmente, assim como de farmácias de Campo Mourão - PR.

- Óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) adquirido da empresa MAPRIC;
- Óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) adquirido da empresa RIKEN;
- Bálsamo de copaíba (*Copaifera* spp.) adquirido da empresa RIKEN;
- Óleo-resina de copaíba (*Copaifera officinalis*) adquirido da empresa FERQUIMA;
- Óleo de copaíba, comercializado pela empresa For Export, adquirido em farmácias de Campo Mourão;
- Óleo de copaíba, comercializado pela empresa Farmax, adquirido em farmácias de Campo Mourão.

No decorrer do texto são utilizados códigos para as amostras de óleos de copaíba {OC-1, OC-2, OC-3, OC-4, OC-5 e OC-6} que não tem qualquer relação com a ordem das amostras aqui apresentadas.

Métodos gerais

Os índices de refração foram determinados em um refratômetro tipo Abbé, manufaturado pela Optronics Inc., em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm (raia D) e à temperatura ambiente. A calibração do aparelho foi feita com água destilada, cujo índice de refração foi de 1,33051 a 33°C. O índice de refração foi ajustado para 20°C utilizando o seguinte o fator de correção: $n_D^{20} = n_{\text{observado}} \pm (\Delta t \times 0,00045)$.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas cromatoplasmas de alumínio adsorvidas com sílica gel 60 utilizando *n*-hexano:acetato de etila (9:1) como eluente. A visualização dos compostos em CCD foi feita por irradiação com lâmpada de ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e por pulverização com uma solução de anisaldeído [4-metóxi-benzaldeído/ácido sulfúrico/ácido acético/metanol (1:2:1:100)] e subsequente aquecimento em uma chapa elétrica.

As análises de CG-EM foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Hewlett Packard 6890, acoplado a um detector seletivo de massas, operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV. O cromatógrafo operava com coluna capilar de sílica fundida do tipo HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Empregou-se hélio de alta pureza como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas com injetor operando a 250°C e interface a 280°C. Os volumes injetados foram de 1 µL de solução, sem divisão de fluxo.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetros Gemini 300P-Varian Instrumentos (300,06 MHz para ¹H e 75,45 MHz para ¹³C). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ, tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano ou o CDCl₃.

Procedimento para determinação do índice de acidez

Pesou-se cerca de 2 g do óleo em um erlenmeyer de 125 mL e a seguir adicionou-se 25 ml da mistura éter etílico:álcool etílico (2:1) acompanhado de agitação. Adicionou-se a seguir 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína e titulou-se com solução 0,1 N de hidróxido de sódio até que a solução passasse de incolor para uma coloração rósea. O índice de acidez (IA) foi calculado pela equação:

$$IA = \frac{V.N.56,1}{m}, \text{ onde:}$$

V = volume de solução de NaOH, em mL, gasto na titulação;

N = normalidade da solução de NaOH;

m = massa da amostra em gramas.

Procedimento para a determinação do índice de éster

Pesou-se cerca de 2 g de óleo em um erlenmeyer, adicionou-se cerca de 5 mL de álcool etílico com agitação e, a seguir, 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% e titulou-se com solução 0,1 N de hidróxido de sódio até que ocorresse a mudança da cor da solução de incolor para rósea. À solução resultante da titulação adicionou-se 20 mL de solução de hidróxido de potássio 4% com uma bureta. Adaptou-se o erlenmeyer a um condensador de refluxo e aqueceu-se a ebulição em banho-maria por 30 min. Após resfriamento da solução, adicionou-se 2 gotas de solução alcoólica 1% de fenolftaleína, e titulou-se com uma solução 0,5 N de HCl até que ocorresse a mudança de cor da solução de rósea para incolor. Realizou-se uma titulação em branco onde estavam presentes todos os reagentes com exceção da amostra de óleo. A diferença entre os dois volumes de solução de HCl está relacionada com a quantidade de hidróxido de potássio gasto na saponificação dos ésteres presentes no óleo. O índice de éster (IE) foi calculado pela equação:

$$IE = \frac{V.N.56,1}{m}, \text{ onde:}$$

V = diferença entre os volumes de solução de HCl gastos na titulação da amostra e do branco em mililitros;

N = normalidade da solução de HCl;

m = massa de amostra de óleo em grama.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de solubilidade de óleos-resina de copaíba em álcool etílico absoluto é utilizado desde o século XIX para verificar a presença de adulterantes como os óleos vegetais e minerais (REDWOOD, 1847; VASCONCELOS & GODINHO, 2002). Segundo este teste, uma parte de óleo-resina de copaíba genuíno é solúvel em duas partes de álcool etílico absoluto. Após a realização deste

teste, com as amostras listadas na **Tabela 1**, observou-se que a maioria das amostras não solubilizaram totalmente nas condições de análise, exceto as amostras OC-1 e OC-6.

Estes dados sugerem uma possível adulteração do bálsamo e da resina de copaíba comercializadas pela empresa Riken. Ao adicionar diferentes teores de óleo de soja nas amostras de óleo-resina e submetê-las novamente ao teste de solubilidade observou-se formação de precipitado branco, tal como nas amostras de bálsamo e de resina de copaíba comercializadas pela empresa Riken.

Posteriormente, as amostras de óleos-resina de copaíba foram submetidas às análises de índice de refração, índices de acidez e de éster, cujos resultados são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Dados obtidos por métodos analíticos convencionais para as diferentes amostras de óleos-resina de copaíba.

Amostra	Solubilidade em EtOH	n_D^{20}	Índice de acidez (mg KOH/g)	Índice de éster (mg KOH/g)	Adulteração* (%)
OC-1	Solúvel	1,49000	33,7	50,3	60,4
OC-2	Pouco solúvel	1,49915	42,5	46,2	50,0
OC-3	Pouco solúvel	1,49668	65,4	39,8	23,0
OC-4	Pouco solúvel	1,50606	36,4	52,9	57,2
OC-5	Pouco solúvel	1,50631	77,9	44,9	8,3
OC-6	Solúvel	1,49656	30,2	48,9	64,5
Óleo mineral	-	1,45662	-	-	-
Óleo de soja	Insolúvel	1,47473	-	-	-

* calculada a partir de sugestão de Vasconcelos & Godinho (2002). Fonte: Os autores (2012).

Os dois mais comuns adulterantes de óleos-resina de copaíba, óleo mineral e de soja, apresentaram índice de refração de 1,45662 e 1,47473, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os reportados por Falate *et al.* (2007). Segundo Barbosa *et al.* (2009) os índices de refração para diferentes amostras de óleo-resina de *C. multijuga*, coletadas na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé (Manaus-AM), variaram entre 1,50184 a 1,50786. No entanto, esta metodologia sozinha parece não ser de grande valia para verificar adulterações, uma vez que o índice de refração de uma amostra contendo até 25% de óleo de soja pode ser muito próximo do intervalo considerado ideal para amostras de óleos-resina de copaíba genuínos. Por exemplo, no trabalho de Barbosa *et al.* (2009)

uma amostra hipotética contendo um óleo-resina de copaíba genuíno e óleo de soja, na proporção de 3:1, apresentou n_D^{20} de 1.50183, enquanto a amostra original apresentou n_D^{20} de 1.50284.

No presente trabalho, os índices de refração para as diferentes amostras de óleos-resina avaliadas apresentaram valores entre 1,49656 - 1,50631. Para as amostras avaliadas, apenas duas (OC-4 e OC-5) possuem valores de índices de refração concordantes com dados reportados na literatura para óleos-resina de copaíba genuínos. As outras amostras apresentam valores de índices de refração abaixo dos considerados ideais para óleos-resina de copaíba e sugerem a adulteração destes materiais com substâncias com menor índice de refração, como é o caso dos óleos mineral e vegetal.

A partir dos valores dos índices de acidez e de éster obtidos, Godinho & Vasconcelos (2002) sugerem que: (i) amostras com índice de acidez menor do que 80 mgKOH/g são adulteradas; (ii) amostras com índice de éster acima de 23 mgKOH/g indicaria que o adulterante é óleo graxo e um valor abaixo deste limite indicaria que o adulterante é um material não saponificável como etanol ou óleo mineral. Levando estas informações em consideração, observa-se pela análise dos resultados de índice de acidez e de éster que todas as amostras estariam adulteradas com óleo graxo. No entanto, este tipo de análise não leva em consideração que algumas amostras de óleo-resina de copaíba possuem alto teor de ésteres metílicos diterpênicos, que sofreriam saponificação tal como um óleo graxo, levando a uma conclusão incorreta no teste de índice de éster.

Os perfis cromatográficos desses óleos-resina de copaíba foram avaliados utilizando cromatografia em camada delgada e revelação com reagente anisaldeído sulfúrico (**Imagem 01**). Neste experimento, observou-se que nenhuma amostra apresentou perfil cromatográfico semelhante ao do óleo de soja. Estes resultados contradizem os obtidos a partir de índice de éster que sugeria que amostras estavam adulteradas com óleo graxo. Entre as seis amostras estudadas, apenas as OC-1 e OC-2 apresentaram perfil cromatográfico semelhante.

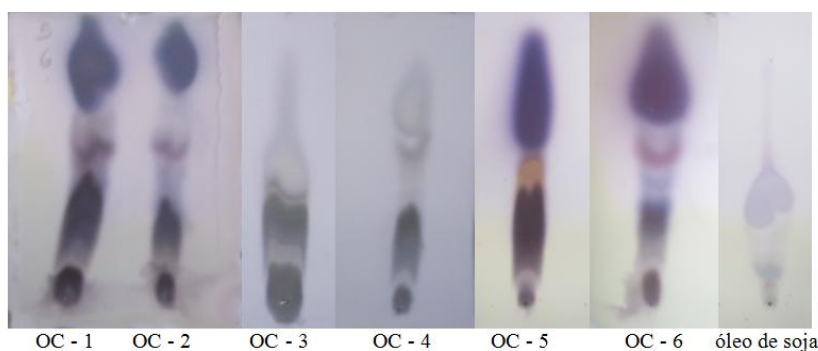


Imagem 01 – Perfil cromatográfico observados em CCD para as para as diferentes amostras de óleos-resina de copaíba.

A fim de comparação com os resultados obtidos através dos métodos analíticos convencionais estudou-se os dados de CG-EM e RMN das amostras de óleo-resina de copaíba. Para isto, utilizou-se vários terpenóides isolados anteriormente de diferentes óleos-resina de copaíba, que foram caracterizados por RMN de ^1H e de ^{13}C (**Imagem 02**) e utilizados como padrões no estudo por CG-EM.

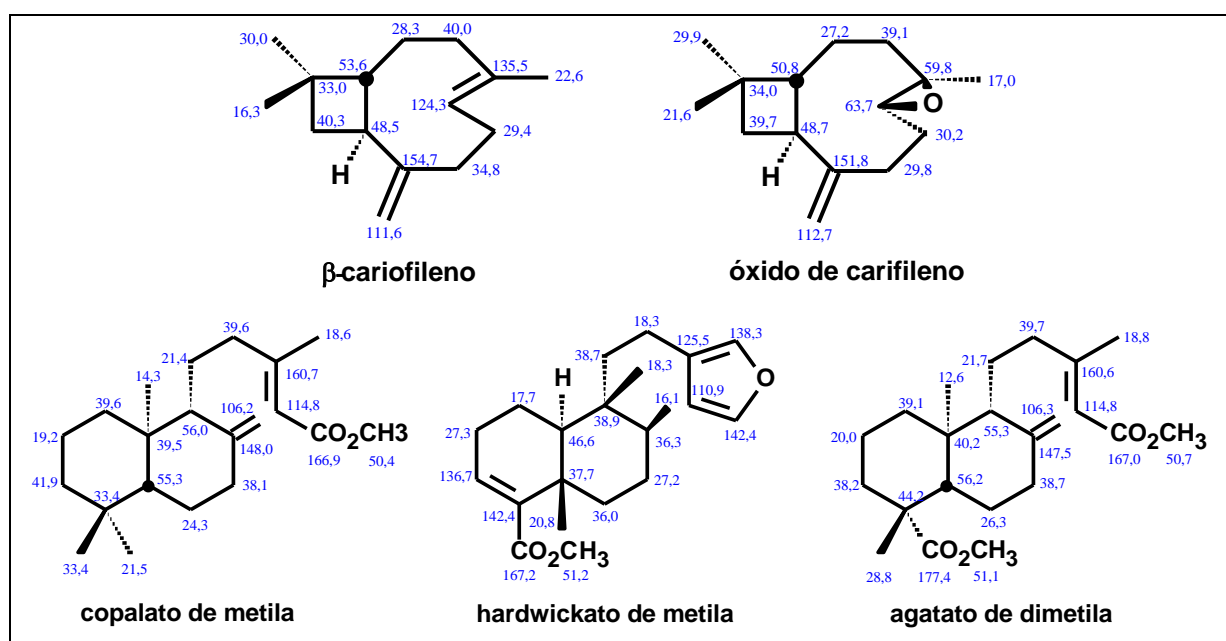


Imagem 02 – Deslocamentos químicos de ^{13}C de alguns terpenóides isolados de óleos-resina de copaíba e utilizados como padrão no estudo de CG-EM.

Os cromatogramas de quatro das amostras de óleos-resina de copaíba estudadas são apresentados na **Imagem 03**. Observou-se, a partir da análise dos cromatogramas, que estes materiais são constituídos majoritariamente por sesquiterpenos e um teor bastante reduzido de ácidos diterpênicos (**Imagem 03**). Nas condições selecionadas observaram-se três grupos de substâncias, resolvidos em faixas de retenções específicas e distintas. Os compostos presentes na região com menor tempo de retenção (~30-40 min.), fração majoritária, correspondem aos hidrocarbonetos sesquiterpênicos. A segunda região (~40-50 min.) corresponde aos epóxidos e alcoóis sesquiterpênicos e a última região (~60-70 min.) é constituída pelos ésteres metílicos dos ácidos diterpênicos (ROMERO, 2007). Para as amostras OC-6 e OC observou-se como composto majoritário o β -cariofileno (tempo de retenção 33.80 min.). Dos quatro CG-EM avaliados nenhum apresentou espectro

de massa característico de ésteres graxos, o que está de acordo com os dados obtidos a partir da análise de CCD.

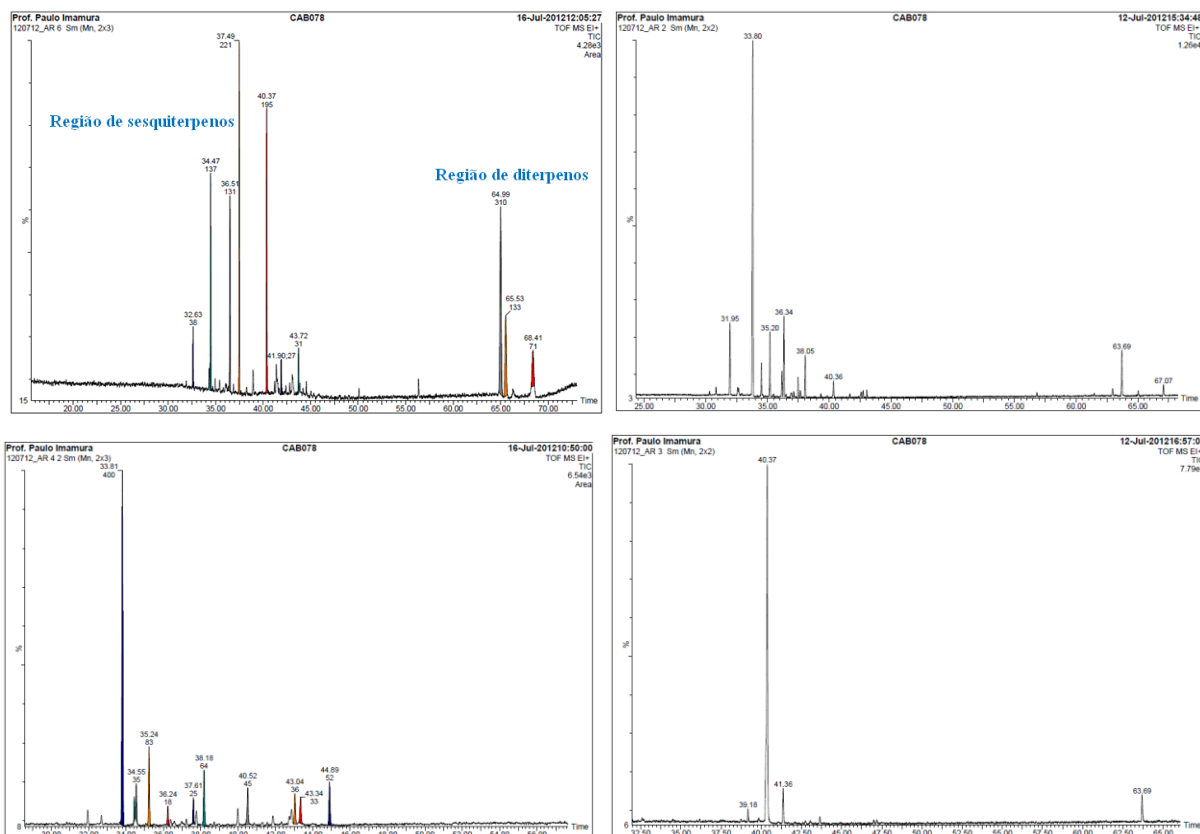


Imagem 03 - Cromatogramas de quatro amostras de óleos-resina de copaíba estudadas neste trabalho:
(a) OC-3; (b) OC-6; (c) OC-5; (d) OC-4.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos pelos índices de acidez e de éster todas as amostras de óleo-resina de copaíba estariam adulteradas. Esta adulteração segundo o trabalho de Godinho & Vasconcelos (2002) seria pela adição de óleo graxo. No entanto, as análises de CCD e CG-EM não corroboram com tal afirmação. Conclui-se desta forma que a utilização de um único método analítico convencional para verificar a adulteração de óleos-resina de copaíba é uma prática inviável devido a grande diversidade química que este produto natural apresenta.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, Karol S.; YOSHIDA, Massayoshi; SCUDELLER, Veridiana V. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1a, p. 57-60, 2009.

BRAGA, Renato. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Editora Universitária da UFRN, p. 401-402, 1960.

CASCON, Vera; GILBERT, Benjamin. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 5, n.7, p. 773-778, 2000.

FALATE, Rosane; NIKE, Karen; NETO, Pedro R. C.; CAÇÃO-JR, Eduardo; MULLER, Marcia; KALINOWSKI, Hypolito J.; FABRIS, José L. Alternative technique for biodiesel quality control using an optical fiber long-period grating sensor. **Química Nova**, v. 30, p. 1677-1680, 2007.

FLEURY, Marie. A propos de l'intérêt médicinal du baume de Copahu. **Acta botanica Gallica**, v. 144, n 4, p. 473-479, 1997.

PARKER, Langston. **The modern treatment of syphilitic diseases**. p. 71-75, 1854.

LEANDRO, Lidiam M.; VARGAS, Fabiano S.; BARBOSA, Paula C. S.; NEVES, Jamilly K. O.; SILVA, José A.; VEIGA-JUNIOR, Valdir F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.

REDWOOD, **Pharmaceutical Journal**, volume VI, p. 13-18, 1847.

ROMERO, Adriano L. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

STILLÉ, Alfred. **A systematic treatise on the action and uses of medicinal agents, including their description and history**. V II, p. 682-689, 1860.

VASCONCELOS, Antônio F. F.; GODINHO, Oswaldo E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1057-1060, 2002

VEIGA JÚNIOR, Valdir F.; PINTO, Ângelo C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.