

CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS FRUTOS DE *Copaifera langsdorffii* Desf.

José de Sousa Lima Neto

Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brasil

Nilce Viana Gramosa\* e Edilberto Rocha Silveira

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências,

Universidade Federal do Ceará, CP 6021, 60455-760 Fortaleza - CE, Brasil

Recebido em 20/4/07; aceito em 15/2/08; publicado na web em 7/8/08

CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE FRUITS OF *Copaifera langsdorffii* Desf. Phytochemical investigation of the hexane extract of fruit shells of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae) afforded *ent*-kaur-16-en-19-oic acid, polyalthic acid, nivenolide and the mixture of caryophyllene oxide and *ent*-kaur-16-en-19-oic acid. The chloroform extract of unripe seeds led to the isolation of coumarin and the GC/MS analysis of the extract allowed the identification of 81.8% of the fatty acid composition after hydrolysis followed by methylation. The main fatty acid identified was oleic acid (33.1%). The isolation of all secondary metabolites was accomplished by modern chromatographic methods and the structure determination was accomplished by spectrometric methods (IR, MS, NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C).

Keywords: *Copaifera langsdorffii*; terpenoids; fatty acids

## INTRODUÇÃO

*Copaifera langsdorffii* Desf é uma árvore da família Leguminosae (Caesalpinioideae) conhecida popularmente por copaíba, pau-d'óleo, podói, cupaúba e cupiúva.<sup>1</sup> As plantas do gênero *Copaifera* encontram-se distribuídas na África e em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul principalmente no Brasil, Venezuela, Guianas e Colômbia. No Brasil são encontradas principalmente nos estados do Pará e Amazonas.<sup>2</sup> Estas plantas fornecem o óleo-resina de copaíba, também conhecido por bálsamo de copaíba, por exsudação do tronco, principalmente de *C. reticulata* (copaíba marimari), *C. officinalis* (copaíba verdadeira) e *C. langsdorffii* (copaíba vermelha),<sup>1,3-5</sup> cujo interesse se deve ao seu variado uso na medicina popular, principalmente como cicatrizante e antiinflamatório.<sup>1</sup>

Embora atualmente sejam descritas 72 espécies de *Copaifera*,<sup>5</sup> apenas 17 apresentam registros na literatura sobre seus estudos químicos, em sua maioria referentes ao óleo-resina de *C. langsdorffii* e espécies de *Copaifera* não identificadas (*Copaifera* sp).<sup>5,6</sup>

Poucas citações foram encontradas na literatura relacionadas com o fruto da copaíba, sendo destacados os relatos sobre ácidos graxos e cumarinas presentes nas sementes. O primeiro relato de cumarinas nas sementes foi citado para *C. salikuonda* Heck, do Sul da África Ocidental.<sup>7</sup> A presença de compostos cumarínicos de *C. langsdorffii* foi descrita pela primeira vez por Mors e Monteiro, que obtiveram 0,65% da cumarina (1) e identificaram a umbeliferona nos extratos etéreos das sementes desta espécie.<sup>7</sup> A identificação dos ácidos graxos: palmítico (24,9%), oleico (35,3%), linoleico (35,7%), araquídico (1,1%) e beênico (3,0%) presentes nas sementes de *Copaifera* sp foi relatada por Maia *et al.*<sup>8</sup> Nas sementes de *C. langsdorffii* foram identificados amilóides xiloglucânicos<sup>9</sup> e nos cotilédones foram encontrados polissacarídeos.<sup>10</sup>

Os estudos químicos e farmacológicos dos óleos essenciais dos frutos e das cascas dos frutos de *C. langsdorffii* em estudo foram descritos em relatos anteriores. Os constituintes principais identificados para o óleo essencial dos frutos foram:  $\gamma$ -muuroleno (29,8%)

e  $\beta$ -cariofileno (14,8), enquanto que para o óleo das cascas dos frutos o constituinte principal era o óxido de cariofileno (47,3%).<sup>6,11</sup> As atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial das cascas dos frutos foram descritas por Paiva *et al.*<sup>12</sup>

Embora os relatos da literatura referentes à copaíba mostrem a importância do estudo do óleo-resina devido às propriedades terapêuticas já descritas, é necessário que outras partes da planta sejam avaliadas, com o objetivo de verificar se há semelhança entre as composições químicas do óleo-resina e de outras partes da planta. O presente trabalho descreveu a metodologia e os resultados obtidos no estudo dos constituintes químicos dos frutos de *C. langsdorffii* coletados na Chapada do Araripe – Crato - CE.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico das sementes verdes de *Copaifera langsdorffii* resultou no isolamento de uma substância sólida incolor identificada como cumarina **1** através dos dados de IV, RMN e EM e comparação com os dados da literatura.<sup>13</sup> Segundo Mayer,<sup>14</sup> esta cumarina é fator importante na dormência das sementes, já que é inibidora natural da germinação. Sendo assim, à medida que a semente amadurece, a cumarina é metabolizada até que o seu teor diminua, favorecendo a quebra da dormência e a germinação das sementes.<sup>14,15</sup>

Os ácidos graxos do extrato clorofórmico das sementes maduras de *C. langsdorffii* foram identificados a partir da análise por CG-EM dos seus respectivos ésteres metílicos obtidos por metilação com diazometano.<sup>11</sup> O cromatograma apresentou 18 picos, cujos espectros de massa foram comparados com os espectros de massa fornecidos pelo banco de dados do equipamento e por comparação visual com espectros de massa encontrados na literatura,<sup>16</sup> resultando na identificação de 11 ácidos graxos, 81,8% do total (Tabela 1).

O ácido graxo insaturado 9,12-octadecadienóico (ác. linoleico) descrito na literatura mostrou ser mais abundante para as sementes de *Copaifera* sp (35,7%)<sup>8</sup> que para as sementes de *C. langsdorffii* (2,6%) neste estudo, enquanto que os teores dos ácidos hexadecanóico (20,2%) e 9-octadecenoico (33,1%) de *C. langsdorffii* apresentaram-se compatíveis com os descritos na literatura para *Copaifera* sp: 24,9

\*e-mail: nilce@dqi.ufc.br.

**Tabela 1.** Composição dos ácidos graxos do extrato clorofórmico das sementes de *C. langsdorffii*

Ácido graxo	Tempo de retenção <sup>a</sup>	Porcentagem (%)
octanóico (caprílico C8:0)	7,7	1,9
decanóico (cáprico C10:0)	9,5	1,8
hexadecanóico (palmítico C16:0)	14,9	20,2
9,12-octadecadienóico (linoleico C18:2)	16,8	2,6
9-octadecenóico (oleico C18:1)	17,0	33,1
octadecanóico (estearíco C18:0)	17,3	7,0
cis-11-eicosenóico (gôndico C20:1)	19,1	1,7
eicosanóico (araquídico C20:0)	19,5	2,7
docosanóico (beênico C22:0)	21,5	3,6
tetracosanóico (lignocérico C24:0)	23,4	5,7
hexacosanóico (cerótico C26:0)	25,2	1,5
Total	-	81,8

<sup>a</sup>Tempo de retenção (min) em coluna OV-5

e 35,3%, respectivamente.

O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das cascas dos frutos de *C. langsdorffii* resultou no isolamento e identificação de três ácidos diterpênicos: ácido caurenóico **2**, ácido poliáltico **3** e nivenolídeo **4**, bem como da mistura do ácido caurenóico e óxido de cariofileno.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de **2** apresentou um singlete largo em  $\delta_H$  2,64 (1H) indicativo de hidrogênio alílico, ligado ao carbono C-13, característico de diterpenos de esqueleto do tipo caureno. Este tipo estrutural foi confirmado pelos sinais característicos dos hidrogênios: H-18 ( $\delta_H$  1,24; s; 3H), H-20 ( $\delta_H$  0,90; s; 3H), H-17 ( $\delta_H$  4,80; s; 1H) e H-17 ( $\delta_H$  4,74; s; 1H).

No espectro de RMN <sup>13</sup>C de **2** o sinal em  $\delta_C$  184,9 foi relacionado ao grupo carboxila e os sinais em  $\delta_C$  156,2 e 103,5 permitiram confirmar a presença da ligação dupla exocíclica do esqueleto caureno. Os dados obtidos por RMN de **2** mostraram-se de acordo com os dados registrados na literatura para o ácido caurenóico, citado como um dos principais constituintes do óleo-resina de copaíba.<sup>17</sup>

No espectro de RMN <sup>1</sup>H de **3**, três singletos característicos de anel furânico monossustituído foram observados em  $\delta_H$  7,35 (H-15); 7,21 (H-16) e 6,27 (H-14). Os sinais em  $\delta_H$  4,89 e 4,61 foram relacionados com hidrogênios metilídenos da ligação dupla exocíclica (H-17). O espectro de RMN <sup>13</sup>C de **3** mostrou um sinal em  $\delta$  185,4, característico de carboxila, além dos sinais em  $\delta$  148,1; 125,8 e 107,4 evidenciando a presença de anel furânico  $\beta$ -monossustituído.

Com os dados obtidos e comparação com dados da literatura<sup>18</sup> foi possível propor que **3** se tratava de um diterpeno furânico de esqueleto labdano conhecido como ácido poliáltico, já isolado de outras espécies de *Copaifera*.<sup>19,20</sup>

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de **4** mostrou dois singletos em  $\delta$  4,91 e 4,63 relacionados aos hidrogênios metilídênicos (H-17) da ligação dupla exocíclica, bem como, os singletos em  $\delta$  1,18 e 0,75, relativos aos hidrogênios metílicos H-19 e H-20, respectivamente, característicos de esqueleto labdânico. Os sinais em  $\delta$  7,12 (1H) e 4,80 (2H), foram atribuídos aos hidrogênios H-14 e H-15 de um butenolídeo  $\alpha$ -substituído. Comparação dos dados obtidos com os dados da literatura relatados para o óleo-resina de copaíba<sup>6</sup> permitiu a caracterização deste composto como o nivenolídeo **4**.<sup>21</sup>

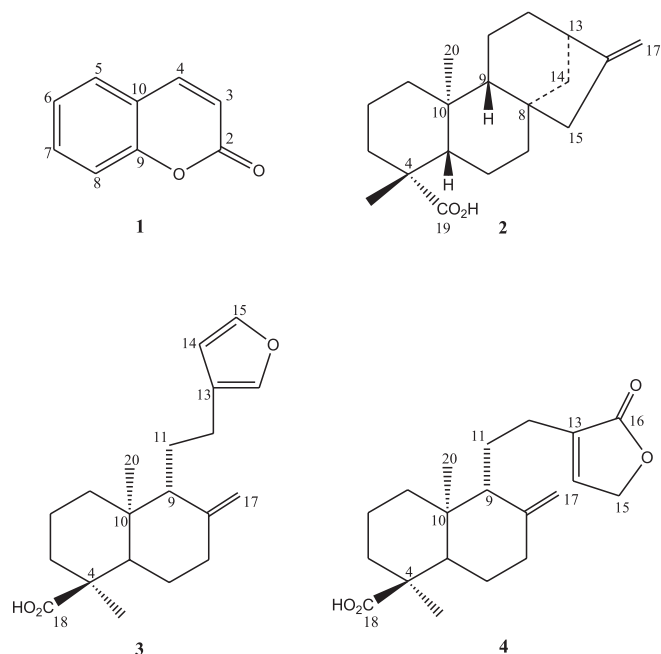
Relatos anteriores para o gênero *Copaifera* mostraram que os ácidos diterpênicos caurenóico, poliáltico e nivenolídeo, bem como o sesquiterpeno óxido de cariofileno são constituintes do óleo-resina de copaíba.<sup>5,6</sup> Este é o primeiro relato destes compostos nas cascas dos frutos do gênero *Copaifera*.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Instrumentação e procedimentos experimentais

Os espectros na região do IV foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 da central analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica-UFC utilizando pastilhas de KBr. Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance DPX – 300 e DRX-500 operando na frequência de hidrogênio-1 a 300,13 MHz e a 500,13 MHz e na frequência do carbono a 75,47 MHz e a 125,75 MHz, respectivamente. Os experimentos unidimensionais de RMN <sup>13</sup>C foram efetuados sob desacoplamento total de hidrogênios. As amostras foram dissolvidas em 0,5 mL de CDCl<sub>3</sub> e acondicionadas em tubos de RMN de 5 mm. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados para RMN <sup>1</sup>H pelo pico do hidrogênio pertencente à fração de clorofórmio não deuterada ( $\delta$  7,27) e para RMN <sup>13</sup>C pelo pico central do tripleto em  $\delta$  77,0 do clorofórmio deuterado. O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN <sup>13</sup>C foi determinado a partir da utilização da técnica DEPT com o ângulo de nutação ( $\theta$ ) de 135°. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de microdeterminação MQPAF – 301 (Microquímica) provido de placa aquecedora modelo FP – 52 e unidade de controle FP – 5. Os espectros de massa dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foram obtidos em espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP – 5971A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP – 5890A série II (CGL-EM), provido de coluna capilar DB-5 (dimetilpolisiloxano) com 30,0 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,1  $\mu$ m, utilizando um gradiente de aumento de temperatura do injetor de 35 a 180 °C/4 °C/min e 180 a 280 °C/20 °C/min.

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas em colunas de vidro de comprimentos e diâmetros variados com gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh) Vetec como fase estacionária. Para as cromatografias em camada delgada analítica (CCD) foram utilizadas lâminas de vidro contendo gel de sílica 60 GF<sub>254</sub> Fluka (Kieselgel) com indicador de fluorescência (254 nm). A revelação das placas CCD foi feita pela exposição das mesmas à lâmpada de



**Figura 1.** Estruturas das substâncias isoladas dos frutos de *Copaifera langsdorffii*

irradiação na faixa do ultravioleta (UV), com dois comprimentos de onda (312 e 365 nm). Após pulverização das placas com solução de vanilina e ácido perclórico em etanol, as mesmas foram aquecidas por 5 min em placa aquecedora a aproximadamente 100 °C.

### Material vegetal

Os frutos de *Copaifera langsdorffii* selecionados para estudo foram coletados na localidade de Barreiro Grande–Crato, Ceará. A excisada da planta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da UFC, registrada sob número 24.461.

### Extração e isolamento dos constituintes químicos

As sementes verdes (469,0 g) de *C. langsdorffii* foram moídas e extraídas com hexano a frio, obtendo-se 11,0 g (2,3%) de uma mistura heterogênea de um óleo amarelo-escuro e um sólido branco que, após recristalização em hexano e filtração, forneceu 1,9 g (17%) de um sólido incolor, identificado como a cumarina **1** [Sólido cristalino incolor, p.f. 67.5-67.7 °C].<sup>15</sup> As sementes maduras (239 g) forneceram 18,7 g (7,8%) de extrato após terem sido moídas e extraídas com clorofórmio por sohxlet. Uma alíquota de 1,0 g deste extrato foi submetida à hidrólise alcalina com 603 mg de KOH dissolvidos em 9 mL de etanol, sob refluxo por 4 h, seguindo a metodologia descrita por Matos.<sup>22</sup> Os ácidos graxos obtidos (758 mg) foram metilados com diazometano, analisados por CGL-EM e identificados a partir da comparação dos espectros de massa de seus respectivos ésteres metílicos com dados da literatura.<sup>16</sup>

As cascas dos frutos (810 g) secas e moídas foram submetidas à extração com hexano utilizando o aparelho de sohxlet para extração a quente. O extrato hexânico foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida resultando num extrato amarelo escuro (CFC-H; 175,7 g; 21,7%).

Uma alíquota de 162,8 g de CFCH foi fracionada através de coluna filtrante com gel de sílica resultando nas frações: hexânica (CFCH-H; 36,1 g; 22,2%), clorofórmica (CFCH-C; 69,3 g; 42,6%), acetato (CFCH-A; 43,2 g; 26,5%) e metanólica (CFCH-M; 3,2 g; 2,0%). A fração CFCH-H foi submetida a tratamento cromatográfico com gel de sílica e eluída inicialmente com hexano, seguido de misturas binárias de hexano:acetato de etila em gradiente de polaridade crescente. As frações obtidas foram reunidas de acordo com suas semelhanças observadas por CCD. A fração 7-8 (360 mg) eluída com hexano foi recromatografada sobre gel de sílica e eluída com os solventes hexano e acetato de etila puros e suas misturas binárias em ordem crescente de polaridade, resultando no isolamento do ácido caurenóico **2** (23,5 mg) [Sólido cristalino incolor, p.f. 178,1-179,7 °C]. A fração 9-10 (200 mg) eluída com hexano:acetato de etila 90:10 foi identificada como uma mistura do ácido caurenóico e óxido de cariofileno **5**. A fração 16 (300 mg) eluída com hexano:acetato de etila 90:10 foi analisada por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e caracterizada como o ácido poliáltico **3** [Sólido branco amorfo, p.f. 98,5-99,8 °C].<sup>20</sup> Parte da fração CFCH-C (10 g) foi cromatografada em coluna cromatográfica sobre gel de sílica e eluição isocrática com hexano:acetato de etila 90:10, resultando no isolamento dos diterpenos ácido poliáltico **3** (150 mg) e nivenolídeo **4** (18 mg) [Sólido branco amorfo].<sup>6</sup>

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FINEP, PRONEX, PADCT e CAPES pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas. Aos Profs. A. G. Fernandes e E. P. Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará pela identificação botânica da planta.

### REFERÊNCIAS

1. Corrêa, M. P.; *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.
2. Willis, J. C.; *A Dictionary of flowering plants and ferns*, 8<sup>th</sup> ed., Cambridge Press: Great Britain, 1973.
3. Veiga Jr., V. F.; Patitucci, M. L.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 612.
4. Gottlieb, O. R.; Iachan, A.; *Revista de Química Industrial* **1945**, *14*, 20.
5. Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 273.
6. Gramosa, N. V.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2001.
7. Mors, W. B.; Monteiro, H. J.; *Anais da Associação Brasileira de Química* **1959**, *18*, 181.
8. Maia, J. G.; Varejão, M. J. C.; Wolter Filho, W.; Mourão, A. P.; Craveiro, A. A.; Alencar, J. W.; *Acta Amazônica* **1978**, *8*, 705.
9. Buckeridge, M. S.; Rocha, D. C.; Reid, J. S. G.; Dietrich, S. M. C.; *Physiol. Plant.* **1992**, *86*, 145.
10. Franco, T. T.; Rodrigues, N. R.; Serra, G. E.; Panegassi, V. R.; Buckeridge, M. S.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *680*, 255.
11. Gramosa, N. V.; Silveira, E. R.; *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 130.
12. Paiva, L. A. F.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N.; Silveira, E. R.; *Resumos do 14º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Florianópolis, Brasil, 1996.
13. Murray, R. D. H.; Mendez, J.; Brown, S. A.; *The Natural Coumarins*, Wiley: New York, 1982.
14. Mayer, A. M.; *The germination of seeds*, 4<sup>th</sup> ed., Pergamon Press: Great Britain, 1989.
15. Borges, E. E. L.; Borges, R. D. G.; Candido, J. F.; Gomes, J. M.; *Rev. Bras. Sementes* **1982**, *4*, 9.
16. Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, 2001.
17. Hutchison, M.; Lewer, P.; Macmillan, J.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1984**, 2363.
18. Carreras, C. R.; Rossomando, P. C.; Giordano, O. S.; *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1031.
19. Braga, W. F.; Pinto, A. C.; Antunes, O. A. C.; *Resumos da 14ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Caxambu, Brasil, 1991.
20. Ferrari, M.; Pagnoni, U. M.; Pelizzoni, F.; *Phytochemistry* **1971**, *10*, 905.
21. Rojas, E. T.; Rodriguez-Hahn, L.; *Phytochemistry* **1978**, *17*, 574.
22. Matos, F. J. A.; *Introdução a Fitoquímica Experimental*, Editora UFC: Fortaleza, 1997.