

## CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA APLICADA AO ISOLAMENTO DA FRAÇÃO ÁCIDA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera multijuga*) E DA SACACA (*Croton cajucara*)

Amaro Gomes Barreto Júnior\* e Evaristo Chalbaud Biscaia Junior

Coordenação dos Programas de Pós-graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CP 68502, 21945-970 Rio de Janeiro - RJ

Valdir Florêncio da Veiga Junior, Angelo C. Pinto e Sergio Freire de Carvalhaes

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21945-970 Rio de Janeiro - RJ

Maria Aparecida M. Maciel

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Química, Campus Universitário, 59078-970 Natal - RN

Recebido em 30/8/04; aceito em 19/11/04; publicado na web em 13/4/05

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY APPLIED TO THE FRACTIONATION OF THE COPAÍBA OIL (*Copaifera multijuga*) AND SACACA (*Croton cajucara*) EXTRACTS. Plant extracts are usually complex mixtures which contain several molecules of different sizes with varied functional groups. Such extracts are a challenge to the chemist of natural products. Ion exchange chromatography in non-aqueous medium, used for separation of basic or acidic fractions from plant extracts, is an important unit operation in preparative scale separations. Anionic macroporous resin in non-aqueous medium was used with success in this study for separation of the acid fraction of *Copaifera multijuga* (Copaiba oil), rich in labdanic diterpenes and for the methanolic extract of *Croton cajucara* (acetyl aleuritoric acid).

Keywords: ion exchange chromatography; *Copaifera multijuga*; *Croton cajucara*.

### INTRODUÇÃO

Extratos brutos vegetais são, normalmente, misturas complexas constituídas quase sempre por diversas classes de produtos naturais, contendo diferentes grupos funcionais. O isolamento destas substâncias, seja para identificação ou, em maior quantidade, para a realização de ensaios farmacológicos, é um processo tedioso que envolve adsorventes caros e grandes quantidades de solventes.

A obtenção de grandes quantidades de substâncias ou extratos semi-purificados para ensaios farmacológicos *in vivo* é, atualmente, uma das etapas essenciais para o estudo de plantas medicinais. Por isso é necessário o desenvolvimento de novas metodologias de fracionamento e isolamento de substâncias obtidas a partir de extratos de plantas.

O processo de separação de produtos naturais bioativos corresponde a três fases principais: extração a partir da matéria vegetal, fracionamento do extrato ou óleo e purificação do princípio ativo.

A primeira etapa normalmente utiliza extratores que operam com solventes. As etapas seguintes, entretanto, podem ser realizadas de diversas maneiras. Quanto mais seletivas forem essas etapas, menor o tempo necessário para obtenção do produto desejado. Em escala de laboratório, a cromatografia de adsorção em sílica é a técnica mais utilizada. Variações desta técnica têm sido apresentadas na literatura, como a adaptação realizada por Pinto e colaboradores<sup>1</sup> da metodologia originalmente desenvolvida por McCarthy e Duthie<sup>2</sup>, utilizando cromatografia “flash”, com sílica impregnada em KOH, para a separação de hidrocarbonetos e álcoois sesquiterpênicos dos ácidos diterpênicos do óleo de copaíba (*Copaifera sp.*).

Industrialmente, o fracionamento de extratos vegetais é desenvolvido por partição, utilizando solventes orgânicos imiscíveis (extração líquido/líquido), e por extração ácido-base.

Quando as moléculas que se deseja separar são substâncias ácidas ou básicas, a utilização de resinas de troca iônica pode ser uma excelente alternativa. Vários inconvenientes das extrações líquido-líquido e ácido-base podem ser minimizados usando-se a cromatografia de troca iônica (CTI), como por ex.: formação de emulsões de difícil separação, que comprometem a eficiência do processo de partição; limitação no uso do solvente de extração, já que os dois líquidos devem ser imiscíveis; extração de compostos não ácidos solúveis em água; custo elevado e periculosidade potencial para o operador em função de manipulação de volumes elevados de solventes, geralmente perigosos; baixa reprodutibilidade e dificuldades de automatização<sup>3,4</sup>.

A cromatografia de troca iônica em meio não aquoso foi aplicada, na década de 1950, para a separação de fitofármacos, utilizando resinas sulfônicas com baixo grau de ligações cruzadas, não apresentando, entretanto, bom desempenho na recuperação das moléculas de interesse<sup>5-7</sup>. Em 1962, Kunin e colaboradores propuseram a utilização de suportes poliméricos macroporosos, com alto grau de ligações cruzadas, os quais não exibiam alteração de porosidade em meio não aquoso<sup>8</sup>. Essas “novas” resinas macroporosas trocadoras de íons apresentaram melhores desempenhos de recuperação, tendo sido utilizadas na separação de antibióticos<sup>9</sup>, proteínas<sup>10</sup> e açúcares<sup>11</sup>. Estudos recentes mostram a aplicação destas resinas também para alcalóides<sup>12,13</sup>, inclusive àqueles presentes em extratos brutos vegetais<sup>4,14</sup>.

Alcalóides foram separados do extrato etanólico de *Peschiera affinis* com alto nível de recuperação (85-96%), utilizando-se resina macroporosa funcionalizada com grupamentos sulfônicos de alta capacidade de troca iônica (1,66 meq/g resina)<sup>14</sup>. Para a concentração dos alcalóides presentes no extrato etanólico de *Cathartus roseus* a utilização de resina de troca iônica mostrou maior eficiência de separação que os métodos clássicos<sup>4</sup>.

Para a separação de ácidos a partir de extratos de origem natural, a utilização da resina aniônica macroporosa em meio não aquoso

\*e-mail: abarreto@peqmail.peq.coppe.ufrj.br

apresenta uma série de vantagens em relação ao processo clássico de cromatografia em coluna de sílica. Estas vantagens, listadas na Tabela 1, motivaram a utilização de resinas de troca iônica na separação de princípios ativos ou extratos contendo substâncias ionizáveis.

**Tabela 1.** Vantagens da cromatografia de troca iônica em relação às colunas de sílica

- pode ser utilizada em escala de laboratório e ser facilmente ampliada (“Scale-Up”) para quantidades maiores, em escala industrial;
- a matriz polimérica tem menor capacidade de adsorção física que o gel de sílica, minimizando a adsorção de substâncias não ácidas em sua superfície, diminuindo a presença de contaminantes;
- as resinas poliméricas com grupamentos funcionais ligados covalentemente podem atuar em diferentes faixas de pH, viabilizando a separação de frações de ácidos ou de bases (no caso de resina catiônica) com diferentes valores de pKa;
- o uso de resinas aniônicas implica em um número menor de etapas e de frações, conseqüentemente, menor gasto de tempo e de material e
- as resinas poliméricas podem ser facilmente recuperadas e reutilizadas, sem perda de capacidade de adsorção.

O objetivo deste trabalho é mostrar a utilização de resina aniônica macroporosa (poliestireno-divinilbenzeno funcionalizada sob a forma de hidróxido de sal de amônio quaternário e de amina terciária) em meio não aquoso, para a obtenção de uma fração de ácidos do óleo de copaíba, obtido de *Copaifera multijuga*, e do extrato metanólico de *Croton cajucara* (Sacaca), duas espécies muito usadas na medicina popular<sup>15</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Obtenção e análise do material vegetal

O óleo de copaíba analisado foi obtido de um espécime de *Copaifera multijuga* Hayne, localizado na Reserva Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, em Manaus - AM.

As cascas da Sacaca (*Croton cajucara* Benth) foram obtidas de um espécime localizado em Belém - PA. As cascas, secas a 40 °C e moídas em triturador de facas horizontal, foram primeiramente extraídas em Soxhlet com hexano durante 48 h, e, em seguida, extraídas em metanol durante 48 h, para a obtenção do extrato metanólico, como descrito por Maciel<sup>16</sup>.

As frações obtidas através da cromatografia de troca iônica (adsorvidas e dessorvidas) foram esterificadas com diazometano e analisadas através de cromatografia em fase gasosa de alta resolução utilizando detecção em ionização de chama (CGAR-DIC) e espectrometria de massas (CGAR-EM). A identificação dos constituintes químicos foi realizada através de comparação dos espectros obtidos com os armazenados na Espectroteca Wiley e com dados de substâncias isoladas e purificadas em trabalhos anteriores.

As análises cromatográficas das frações do óleo de copaíba foram realizadas em cromatógrafo a gás (Hewlett Packard - modelo 5890), coluna SE-54 com 20 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase, nas seguintes condições: gás de arraste Hidrogênio, com vazão de 2 ml/min e divisão de fluxo (“split”) de 1:20. A temperatura inicial foi ajustada em 120 °C, com taxa de aquecimento de 2 °C/min até 160 °C, quando a taxa de aquecimento passou a ser igual a 10 °C/min até a temperatura final de 270 °C, mantida constante por 5 min.

As amostras esterificadas com diazometano, provenientes do fracionamento do extrato metanólico de *Croton cajucara*, foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (equipamento Hewlett Packard - modelo 6890 MSD), coluna DB5 com 60 m de comprimento, 0,249 mm de diâmetro, 0,25 µm de espessura de fase, nas seguintes condições: gás de arraste Hélio, com vazão de 1,6 ml/min, sem divisão de fluxo (“splitless”). A temperatura inicial foi ajustada em 55 °C e mantida constante por 2 min, seguindo uma taxa de aquecimento de 4 °C/min até atingir a temperatura final de 320 °C, a qual foi mantida constante por 10 min.

### Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau “para análise” e os solventes foram destilados antes de serem utilizados.

### Purificação e ativação da resina

Aproximadamente 500 g de resina aniônica macroporosa de copolímero de estireno-co-divinilbenzeno funcionalizada sob as formas de amina terciária e sal de amônio quaternário (Lewatit MP 64, de fabricação Bayer), foram purificadas/ativadas de acordo com o seguinte procedimento, desenvolvido por Green e colaboradores<sup>17</sup>:

- eluição com 8 L de HCl 1,7 M, a uma vazão de 3 ml/min;
- lavagens sucessivas com 1,3 L de água, 8 L de NaOH 1,7 M, 4 L de água, 8 L de uma mistura 1:1 de *n*-propanol:água e 8 L de *n*-propanol, na mesma vazão descrita no item 1 e
- extração em Soxhlet durante 24 h com éter etílico e 24 h com éter de petróleo.

### Adsorção e dessorção da fração ácida em resina trocadora de íons

Uma coluna de vidro de 50 cm de comprimento e 0,9 cm de diâmetro foi empacotada com 20 g da resina (purificada/ativada) em suspensão com a solução usada para a eluição da coluna: tolueno:etanol (1:1). A coluna foi conectada a uma bomba Milton Roy por meio de tubos e conexões de teflon de 1/8" e condicionada com 250 mL da mesma solução, sob vazão de 1,5 mL/min. A amostra (1 g), diluída em 250 mL da solução de eluição, foi injetada na coluna. A fração não ácida foi eluída com 250 mL da solução de eluição à mesma vazão da usada no condicionamento da coluna. A dessorção dos ácidos carboxílicos adsorvidos na resina aniônica foi realizada por extração em Soxhlet (250 mL de tolueno e 6 mL de ácido fórmico) por 4 h (Figura 1). Todos os solventes foram recuperados em evaporador rotatório (pressão de 1 mm de Hg), a 40 °C.

A dessorção dos ácidos presentes na coluna foi desenvolvida em soxhlet, para alcançar a maior quantidade possível de ácidos dessorvidos.

O rendimento de recuperação (de dessorção) com solução de ácido fórmico na própria coluna depende da vazão, da concentração de ácido fórmico e do tempo de dessorção. Por essas razões, foi utilizado soxhlet com solução de ácido fórmico 0,4% em tolueno e etanol (1:1). Esta concentração de ácido fórmico é suficiente para garantir 100% de rendimento de recuperação, na temperatura de vaporização da mistura tolueno-ácido fórmico, pois estes formam azeótropo à pressão ambiente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo de copaíba é extraído de várias espécies do gênero

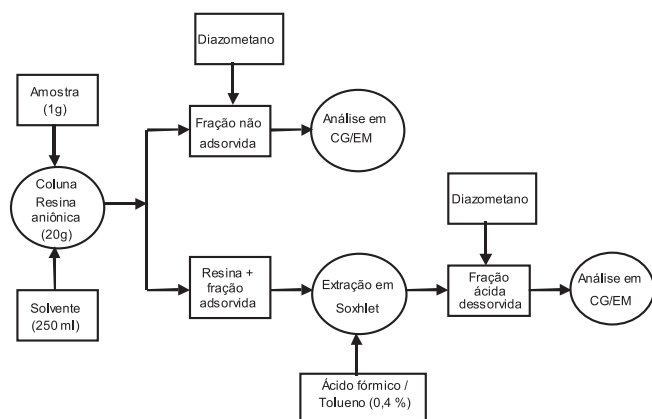


Figura 1. Fluxograma das etapas do processo

*Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae). Amplamente utilizado na medicina popular como anti-inflamatório e cicatrizante, este óleo é encontrado em grande parte das feiras livres, mercados populares, ervanários e farmácias de produtos naturais de todo o país. Os óleos de copaíba são constituídos por misturas de sesquiterpenos, predominantes na maioria deles, e de diterpenos<sup>18</sup>. A indústria de perfumes e cosméticos tem mostrado grande interesse na fração de sesquiterpenos, responsável pelo aroma do óleo de copaíba. O valor de concentrados de sesquiterpenos de *Copaifera* chega a ser 600 vezes maior que o do óleo bruto<sup>19</sup>. Quanto aos diterpenos, há registros na literatura de 28 diterpenos diferentes com os esqueletos caurano, labdano e clerodano. Entretanto, apenas o ácido copálico está presente em todas as espécies estudadas por Veiga Jr e colaboradores<sup>19</sup>.

Do ponto de vista farmacológico, a aplicação do óleo e de suas frações é objeto de vários estudos. Há registros de atividade anti-inflamatória na fração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos<sup>20</sup>, assim como de atividade antitumoral entre os constituintes da fração de diterpenos<sup>21</sup>. Artigo recente de revisão lista as atividades farmacológicas e os constituintes químicos dos óleos de copaíba<sup>19</sup>.

*Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae) é popularmente conhecida como sacaca, sendo muito utilizada na medicina popular na região Amazônica. O uso desta planta vem se difundindo por todo o país<sup>16</sup>. Apesar disto, os estudos farmacológicos sobre esta planta são recentes. A partir de 1996, foram demonstradas as atividades anti-inflamatória, antitumoral e antiestrogênica da *trans*-desidrocrotina, um 19-*nor*-diterpeno neutro majoritário nas cascas de árvores adultas (idade acima de 3 anos)<sup>16</sup>. Foram observadas também atividades antiespasmódica, anti-inflamatória e antinociceptiva do triterpeno ácido acetil aleuritólico, um ácido majoritário nas cascas de árvores jovens (idade até 2 anos)<sup>16</sup>.

### Fracionamento do óleo de copaíba

O perfil cromatográfico do óleo de *Copaifera multijuga* (Figura 2) apresenta dois grupos de substâncias bem distintas: hidrocarbonetos e álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos<sup>18</sup>. Após adsorção em resina aniônica macroporosa é possível observar a separação bem definida destas duas frações. Na fração não adsorvida não se observa a presença de ácidos carboxílicos diterpênicos, assim como na fração destes ácidos não foi detectada a presença de compostos neutros (hidrocarbonetos e álcoois sesquiterpênicos), como pode ser observado nas Figuras 3 e 4.

Na fração ácida (fração adsorvida) foram identificados através dos espectros de massas, em conjunto com os dados de tempo de

retenção relativa<sup>22</sup>, os seguintes ácidos carboxílicos diterpênicos: copálico, colavenico, 3 $\beta$ -hidróxi-copálico, agático e 3 $\beta$ -acetóxi-copálico (Figuras 4 e 5). Convém observar que não ocorreu qualquer discriminação na adsorção química destes ácidos diterpênicos, uma vez que o perfil cromatográfico desta fração é idêntico ao dos ácidos carboxílicos obtidos desta mesma amostra por eluição em gel de sílica impregnada com KOH<sup>1,22</sup>.

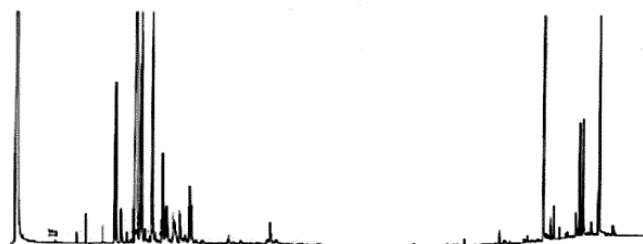


Figura 2. Cromatograma do óleo de copaíba (esterificado com diazometano)



Figura 3. Cromatograma da fração não adsorvida

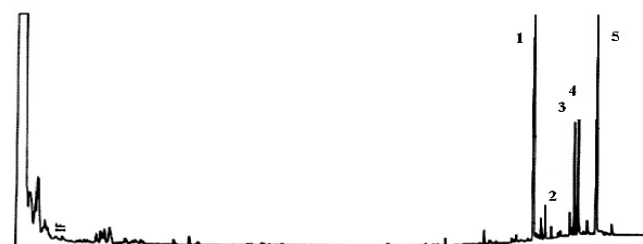


Figura 4. Cromatograma da fração adsorvida (esterificada com diazometano)

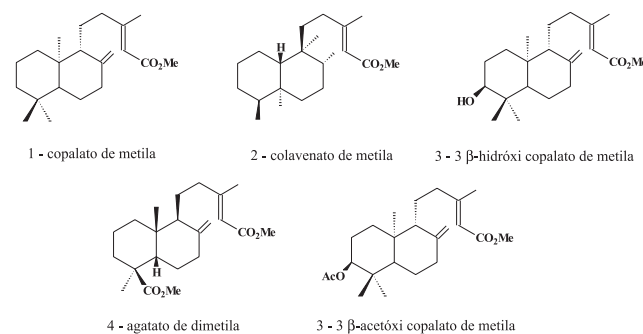
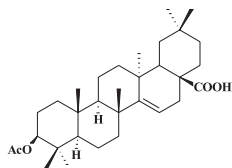


Figura 5. Principais diterpenos ácidos extraídos por cromatografia de troca iônica do óleo de *Copaifera multijuga*

### Fracionamento do extrato metanólico de *Croton cajucara*

O fracionamento do extrato de metanólico de *Croton cajucara* com resina aniônica, desenvolvido de acordo com a metodologia representada na Figura 1, permitiu a separação de ácidos carboxílicos lineares de 15 a 28 átomos de carbono e do triterpeno ácido acetil aleuritólico (Figura 6). A identificação destas substâncias foi feita com base na interpretação dos seus dados de massas e por comparação destes dados com os perfis de padrões disponíveis na Espectroteca Wiley, e com os dados de substâncias padrão<sup>16</sup>.



**Figura 6.** Ácido acetil aleuritólico, extraído por cromatografia de troca iônica do extrato metanólico de *Croton cajucara*

### CONCLUSÕES

A técnica de cromatografia de troca iônica em meio não aquoso foi aplicada com sucesso na separação dos ácidos diterpênicos do óleo de *Copaifera multijuga* e de ácidos lineares e do ácido triterpênico acetil aleuritólico de *Croton cajucara*. A seletividade da separação de frações ácidas é alta, pois não há substâncias não ácidas na fração adsorvida e não há substâncias ácidas na fração eluída.

O presente trabalho abre perspectivas para a utilização desta técnica, não só para a concentração de frações ácidas presentes em pequenas quantidades em extratos bioativos como, também, pode ser aplicada para a concentração de substâncias ácidas de extratos e óleos em escala preparativa.

### AGRADECIMENTOS

À CAPES e à FAPERJ.

### REFERÊNCIAS

- Pinto, A. C.; Braga, W. F.; Rezende, C. M.; Garrido, F. M. S.; Veiga Jr, V. F.; Bergter, L.; Patitucci, M. L.; Antunes, O. A. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 355.
- McCarthy, R. D.; Duthie, A. H.; *J. Lip. Res.* **1962**, *3*, 117.
- Zief, M.; Kiser, R.; *Am. Lab.* **1990**, *70*.
- Carvalhoes, S. F.; Costa, D. L.; Mazzei, J. L.; d'Avila, L. A.; Taddei, L. E. M.; *Rev. Bras. Farmacog.* **2002**, *12*, 83.
- Berggren, A.; Bjorling, C. O.; Willmanjohnson, B.; *Acta Chem. Scand.* **1958**, *12*, 1521.
- Mcguire, T. A.; Vanetten, C. H.; Earle, F. R.; *J. Am. Pharm. Assoc.* **1957**, *46*, 247.
- Mehltretter, C. L.; Weakley, F. B.; *J. Am. Pharm. Assoc.* **1956**, *46*, 193.
- Kunin, R.; Meitzner, E.; Bortnick, N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 305.
- Güzeltonç, E. E.; Ülgen, K. Ö.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *914*, 67.
- Avramescu, M. E.; Borneman, Z.; Wessling, M.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1006*, 171.
- Matijašević, Lj.; Vasic-Racki, D.; *Biochem. Eng. J.* **2000**, *4*, 101.
- Barreto, A. S.; Siani, A. C.; Amaral, A. C. F.; Nunes, D. S. S. G.; Veiga Jr, V. F.; Pinto, A. C.; Soares, K. C. C.; Taddei, L. E. M.; Carvalhoes, S. F.; *Resumos do II Simpósio Brasileiro de Farmacognosia*, Curitiba, Brasil, 2001.
- Albuquerque, M. E. L. R.; Viana, L. C. C.; Andrade, J. F. F.; *WO pat 95/01984* **1995**.
- Soares K.; Carvalhoes S. F.; Taddei L. E. M.; *Resumos da 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 2000.
- Maciél, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr, V. F.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 429.
- Maciél, M. A. M.; Pinto, A. C.; Arruda, A. C.; Pamplona, S. G. S. R.; Vanderlinde, F. A.; Lapa, A. J.; Cólus, I. M. S.; Echevarria, A.; Grynberg, N. F.; Farias, R. A. F.; Luna-Costa, A. M.; Rao, V. S. N.; *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *70*, 41.
- Green, J. B.; Hoff, R. J.; Woodward, P. W.; Stevens, L. L.; *Fuel* **1984**, *63*, 1290.
- Veiga Jr, V. F.; Pinto, A. C.; Patitucci, M. L.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 612.
- Veiga Jr, V. F.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 273.
- Veiga Jr, V. F.; Pinto, A. C.; Calixto, J. B.; Zunino, L.; Patitucci, M. L.; *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 476.
- Ohsaki, A.; Yan, L. T.; Ito, S.; Edatsugi, H.; Iwata, D.; Komoda, Y.; *Bio-org. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2889.
- Veiga Jr, V. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2004.