

ÁCIDOS CICLOPENTÊNICOS DO ÓLEO DA SAPUCAINHA (*Carpotroche brasiliensis* Endl, Flacourtiaceae): O PRIMEIRO ANTILEPRÓTICO USADO NO BRASIL

Adriana S. Oliveira, Josélia A. Lima, Cláudia M. Rezende* e Angelo C. Pinto

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Bloco A, Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 5/3/08; aceito em 1/8/08; publicado na web em 20/1/09

CYCLOPENTENYL ACIDS FROM SAPUCAINHA OIL (*Carpotroche brasiliensis* Endl, Flacourtiaceae): THE FIRST ANTILEPROTIC USED IN BRAZIL. The chaulmugra oil is one of the oldest medicines used for leprosy until the development of sulfas. In Brazil, it is known as sapucainha oil that is obtained from *Carpotroche brasiliensis* seeds (Flacourtiaceae). Chemical and medicinal studies of sapucainha oil were introduced in Brazil by Peckolt, Cole and Cardoso which showed that major cyclopentenyl fatty acids as chaulmoogric, hydnocarpic and gorlic were responsible for its bactericidal activity. In this work, a method for quantification of sapucainha oil acidic fraction by HRGC was established using methyl *n*-heptadecanoate as internal standard. The oil chemical stability was investigated by the use of GC-MS, IR, ¹H and ¹³C NMR and showed that the main degradation products belong to the cyclopentenyl moiety oxidation.

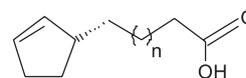
Keywords: *Carpotroche brasiliensis*; cyclopentenyl fatty acids; antileprotic.

INTRODUÇÃO

A espécie *Carpotroche brasiliensis* Endl. (Flacourtiaceae) é uma árvore de médio a grande porte, que produz frutos de casca rígida e polpa carnuda. Sua casca apresenta protuberâncias que lembram franjas, daí a origem de um de seus nomes populares, fruta de babado. Por sua rigidez, semelhante à sapucaia, levou o nome de sapucainha, como é hoje normalmente conhecida. O fruto é muito apreciado por cotias e macacos, dando-lhe os nomes populares de fruta de cotia ou fruta de macaco. É encontrada nas florestas montanhosas dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Piauí. Segundo Pio Correa, o óleo extraído da *C. brasiliensis* tem função inseticida, parasiticida, é eficaz no combate à caspa, piolhos e nas manifestações herpéticas.¹

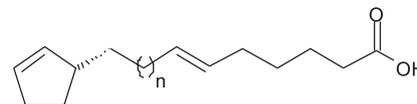
As flacurtiáceas estão bem representadas nas florestas tropicais asiáticas. Foram tratadas em sua plenitude por Hutchinson, que dividiu a família em 90 gêneros com cerca de 1280 espécies, entre os quais destaca-se o gênero *Hydnocarpus* como o mais abundante.² O óleo extraído das sementes de flacurtiáceas é conhecido como óleo de chaulmugra (ou chaulmoogra), cujos constituintes majoritários são os ácidos graxos ciclopentênicos: chaulmúgrico (1), hidnocárpico (2) e górlico (3) (Figura 1). Estes óleos, durante muito tempo até o aparecimento das sulfas em 1940, foram o principal remédio para o tratamento da lepra. No Brasil, a principal espécie fornecedora do óleo de chaulmugra, aqui amplamente conhecido como óleo de sapucainha, é a *Carpotroche brasiliensis* Endl..

As descrições do uso medicinal do óleo de chaulmugra são anteriores à era cristã. Diz a lenda pré-budista que o rei Rama, da Birmânia, abandonou o trono e foi para o interior da floresta esconder sua moléstia incurável. Ali, alimentando-se das folhas e frutos da árvore *kalaw*, curou a si próprio e a princesa Piya, que também se encontrava na selva segregada pela doença.³ Em 1771, no Tesouro da Medicina (*Makhzan-Adwiya*), o médico persa Muhammed-Husein cita o óleo *chawul mungri* para designar o óleo extraído das sementes da espécie *Hydnocarpus kurzi*.⁴ O óleo de chaulmugra foi incluído,



n = 9 Ácido chaulmúgrico (1)

n = 7 Ácido hidnocárpico (2)



n = 5 Ácido górlico (3)

Figura 1. Ácidos graxos ciclopentênicos majoritários presentes no óleo de chaulmugra

em 1898, na 4ª edição da British Pharmacopeia e na 1ª Farmacopéia Venezuelana.

A chaulmugroterapia foi implementada no ocidente apenas no século XIX. Theodoro Peckolt, farmacêutico alemão que em 1848 se radicou no Rio de Janeiro, foi o primeiro a sugerir o uso do óleo de *C. brasiliensis* no tratamento de leproso.⁵ Em “Análises da Matéria Médica Brasileira”, Peckolt recomenda fortemente o uso deste óleo como sucedâneo do óleo de chaulmugra indiano. Além disso, Peckolt foi pioneiro na obtenção dos ácidos graxos ciclopentênicos majoritários do óleo, em 1869. Segundo Da Silva,⁶ todos os ácidos obtidos por Peckolt eram misturas, embora ele os tivesse denominado com nomes específicos como ácidos carpotróchico, carpotróchico e carpotrolênico. No início do século XX, Power e colaboradores⁷⁻⁹ isolaram os ácidos chaulmúgrico (1) e hidnocárpico (2) das sementes de *H. kurzii*, *H. wightiana* e *H. anthelmintica* e estabeleceram suas fórmulas moleculares. Ao mesmo tempo, as virtudes parasitocidas e antileproticas do óleo de chaulmugra eram exaltadas por cientistas estrangeiros e brasileiros, como Pio Correa, que retornavam do exterior impressionados com os bons resultados alcançados com o emprego da chaulmugra e insistiam na sua utilização clínica.¹

*e-mail: crezende@iq.ufrj.br

Os ácidos graxos livres eram mal tolerados tanto por via oral quanto intravenosa, causando transtornos gástricos e problemas respiratórios. Em 1921, J. Carvalho Del Vecchio preparou os ésteres etílicos destes ácidos a fim de que Eduardo Rabelo os experimentasse no Hospital dos Lázaros no Rio de Janeiro.⁶

Da Silva avaliou o perfil farmacológico do óleo de chaulmugra brasileiro usando diferentes vias de administração e formas farmacêuticas. Confirmou que os ésteres etílicos eram melhor tolerados que os ácidos graxos livres e concluiu que os ácidos graxos ciclopentênicos saturados eram os responsáveis pela ação contra o bacilo da lepra.⁶

Nesta época, Paulo Seabra, então farmacêutico pela Universidade do Brasil, iniciou seus estudos com o óleo da espécie *C. brasiliensis* a pedido de seu mestre Orlando Rangel. Seus resultados foram apresentados à Academia Nacional de Medicina por Belmiro Valverde, em 1922, mostrando as primeiras observações científicas de leproso tratados com derivados do óleo. Seabra produziu os sais cúpricos coloidais dos ácidos, produto que veio a ser conhecido como *Karpotran*, baseado na ação do cobre no tratamento da hanseníase. O sucesso deste sal foi difundido em encontros científicos internacionais, que culminou com seu emprego por todo mundo e em especial nos hospitais da Índia, Grécia e França. Sua aplicação endovenosa acabou por restringir seu uso, já que enfermeiros não eram autorizados a realizar este procedimento e os médicos se queixavam sobre dificuldades na manipulação do sal. Seabra foi o primeiro a nomear a *C. brasiliensis* de chaulmugra brasileira.¹⁰

Todos estes estudos culminaram na preparação e comercialização de diversos derivados da mistura de ácidos, como o *Antileprol* (mistura dos ésteres benzílicos, Figura 2) da Bayer e o *Antileprina* da Casa Granado (ésteres etílicos acrescidos de óleo de fígado de bacalhau, cânfora e timol).⁶ Atualmente, o óleo das sementes da sapucainha é comercializado no tratamento de dermatoses (Figura 2).



Figura 2. Medicamentos comerciais preparados a partir do óleo da sapucainha. Adaptado da ref. 6

Jacobsen e colaboradores¹¹ confirmaram a atividade bacterios-tática do ácido hidnocárpico (2), que foi capaz de inibir *in vitro* 38 linhagens de bactérias. Dois anos depois, os sais sódicos do óleo de chaulmugra e do ácido chaulmúgrico (1) mostraram-se potentes inibidores na multiplicação do *Mycobacterium leprae* em patas de ratos infectadas com este bacilo.¹²

A estrutura do ácido chaulmúgrico (1) foi determinada, em 1925, por Schriener e Adams.¹³ Um ano depois, Da Silva⁶ isolou os ácidos chaulmúgrico (1) e hidnocárpico (2) das sementes de *C. brasiliensis* e em 1928, André e Jouatte¹⁴ isolaram o ácido górrico (3) da espécie *Oncoba echinata*. Entre 1937 e 1938, o óleo das sementes de *C. brasiliensis* foi estudado por Paget na Inglaterra e por Cole e Cardoso, no Brasil, que encontraram este mesmo ácido. Paget foi o primeiro a propor sua estrutura química e a mencionar sua atividade ótica.¹⁵⁻¹⁸ Estes mesmos pesquisadores determinaram o teor destes ácidos no óleo de *C. brasiliensis*, que foi descrito como tendo 24,4% de ácido

chaulmúgrico (1), 45,5% de ácido hidnocárpico (2) e 15,4% de ácido górrico (3), acompanhados de 6,6% de ácido palmítico, 6,3% de ácido oléico e de uma série homóloga de ácidos ciclopentênicos de cadeia carbônica menor. Nesta análise, foi usada a técnica de destilação fracionada dos ésteres etílicos acompanhada da cristalização fracionada,^{17,19} que é o método empregado até hoje para o isolamento destes ácidos em escala preparativa.⁴

Paget, Cole e Cardoso observaram que o óleo apresentava sinais de degradação quando extraído das sementes de sapucainha coletadas há mais de 1 ano, sendo extremamente irritante. Paget associou esta mudança à presença de produtos de oxidação, principalmente hidróxi e ceto-ácidos, aos quais denominou de ácidos tárricos (*tarry acids*),^{7,15} e Cole e Cardoso sugeriram que estes compostos fossem oriundos da decomposição do ácido górrico.¹⁷

A partir de 1927, foram descritos procedimentos sintéticos para a obtenção dos ácidos chaulmúgrico (1) e hidnocárpico (2), na forma racêmica.²⁰⁻²³ Em 1955, Mislow e Steinberg relataram a síntese total do ácido chaulmúgrico (1) oticamente puro, mostrando que seu único centro assimétrico possui configuração R.²⁴

O quadro de evolução da hanseníase pode acarretar reações imunológicas que produzem febre e inflamação da pele. Sabendo que análogos de precursores de ácidos graxos podem servir como inibidores competitivos da formação de prostaglandinas e produtos de lipoxigenase, que a maioria dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são ácidos orgânicos de classes variadas e que os ácidos de *C. brasiliensis* são estruturalmente relacionados às prostaglandinas, o óleo da chaulmugra brasileira foi recentemente avaliado quanto a sua ação antiinflamatória e analgésica, mostrando atividade significativa. No ensaio de toxicidade, foi observado que a mistura dos ácidos ciclopentênicos não causou lesão na mucosa gástrica, muito comum na administração de AINEs, mas sua janela terapêutica mostrou-se pequena.^{25,26}

A padronização de extratos vegetais bioativos se dá pelo monitoramento de sua constituição química e é uma necessidade premente na área de fitoterápicos. As técnicas de análise mais empregadas fazem uso da cromatografia e, especificamente no caso de ácidos graxos, estes são frequentemente analisados na forma de seus ésteres metílicos (conhecidos como FAME ou *fatty acid methyl ester*) por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC).²⁷

Neste trabalho, foi estabelecida uma metodologia para a determinação do teor dos ácidos graxos presentes no óleo extraído das sementes de *C. brasiliensis* (chaulmugra brasileira) após saponificação e esterificação com solução de diazometano em éter etílico, fazendo uso da técnica de padronização interna com *n*-heptadecanoato de metila como padrão interno na cromatografia em fase gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC). Além disso, foi investigada por espectrometria de massas acoplada à CG a natureza dos produtos de degradação presentes no óleo de sapucainha envelhecido.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e solventes

Sal de diazald (*N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluenossulfonamida), KOH, MgSO₄, elaidato de metila, ácido mirístico, *n*-heptadecanoato de metila, solução aquosa de HCl (37%) CH₂Cl₂, CHCl₃, isopropanol, éter etílico, hexano, acetato de etila e metanol foram adquiridos da Tédia, Vetec e Merck.

Instrumentação

Os espectros de RMN de ¹H (300 MHz) e de ¹³C (75 MHz) foram obtidos num equipamento Brüker modelo AC-300. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado, com tetrametilsilano

(TMS) como referencial interno. Para as análises de espectrometria no infravermelho, foi utilizado o espectrofotômetro Nicolet Magna IR 760, com pastilhas comprimidas em brometo de potássio anidro e filmes em células de brometo de potássio.

Material vegetal

Os frutos de *Carpotroche brasiliensis* Endl. (Flacourtiaceae) foram coletados na Serra do Caparaó, MG, pelo Dr. G. F. Pinto, em 2003. Uma excisada do material vegetal foi depositada no herbário do Museu Nacional da UFRJ, sob o número R-203170.

Extração dos ácidos graxos

30 g de sementes secas de *C. brasiliensis* foram maceradas em um gral e extraídas com 260 mL de diclorometano/isopropanol 2:1. Em seguida, as sementes foram extraídas com clorofórmio/metanol 2:1 (3 x 150 mL) até o esgotamento, os extratos foram reunidos e os solventes eliminados em evaporador rotatório, resultando num óleo marrom escuro (12 g, 40% p/p). O material foi saponificado sob refluxo durante 6 h com solução etanólica de KOH (100 mL, 10% p/v), seguido de remoção do solvente à pressão reduzida, diluição com 150 mL de água e extração com hexano (3 x 75 mL). Acidificação a pH 1 foi feita com solução aquosa de HCl (10%) seguida de extração com éter etílico (5 x 75 mL). A fase etérea foi seca sob sulfato de magnésio anidro e após evaporação à pressão reduzida obteve-se 9,0 g da mistura de ácidos graxos (30% p/p). Este óleo recebeu o código A1 e foi acondicionado em frasco âmbar, fechado e guardado em geladeira. Uma amostra deste óleo foi mantida em frasco de vidro claro, tampado e a temperatura ambiente (A2), sobre a bancada de trabalho por 3 anos, para o estudo do seu envelhecimento.

Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC) e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Para a CG-DIC foi utilizado um equipamento Agilent 5890 (Palo Alto, Califórnia) com injetor sem divisão de fluxo a 290 °C (0,5 min), coluna capilar DB-5 (J&W; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e detector de ionização de chama a 290 °C. He foi usado como gás de arraste com fluxo de 2 mL min⁻¹ e a programação do forno cromatográfico foi iniciada a 60 °C seguido de taxa de aquecimento de 18 °C min⁻¹ até 310 °C. O volume de injeção foi de 2,0 µL.

Para a análise de CG-EM foi utilizado o equipamento Agilent 6890 Series GC System acoplado a um espectrômetro de massas modelo Agilent 5973 Mass Selective Detector, controlados por computador através do software Standard ChemStation G1701AA versão 3 (1996). Foi usado injetor sem divisão de fluxo a 290 °C (0,5 min), coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), gás de arraste He com fluxo de 2 mL min⁻¹ e a programação do forno cromatográfico foi iniciada a 45 °C (1 min), seguido de taxa de aquecimento de 30 °C min⁻¹ até 130 °C (3 min) e uma segunda rampa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 300 °C (5 min). O volume de injeção foi de 1,0 µL.

Determinação do teor dos ácidos graxos

A mistura de ácidos graxos foi esterificada com solução etérea de diazometano, preparada de acordo com Vogel.²⁸

A solução estoque do padrão elaidato de metila (1 mg mL⁻¹) foi preparada diluindo 10,0 mg do éster em diclorometano e ajustando o volume em balão volumétrico a 10 mL. O elaidato de metila foi utilizado para a construção da curva analítica pela indisponibilidade de padrões de ácidos ciclopentênicos.

A solução estoque do padrão interno *n*-heptadecanoato de metila foi preparado da mesma forma e a solução estoque do padrão para avaliação da recuperação (*surrogate*) foi preparada com 6,0 mg de miristato de metila em 5,0 mL de diclorometano em balão volumétrico.

A linearidade do sistema analítico foi avaliada injetando no CG-DIC soluções de elaidato de metila nas concentrações de 1, 25, 50, 100 e 250 µg mL⁻¹ em diclorometano, em triplicata. Em cada ponto da curva foi adicionado o padrão interno de *n*-heptadecanoato de metila, de modo que a concentração final fosse de 50 µg mL⁻¹. Para a construção da curva foi adotada a razão entre as áreas de analito e do padrão interno como variável dependente (eixo y) e a razão entre as concentrações do analito (elaidato de metila) e o padrão interno como variável independente (eixo x). A análise da linearidade da curva foi realizada pelo método dos mínimos quadrados e o aplicativo Excel foi utilizado na elaboração e avaliação dos resultados.

Preparo das amostras de *C. brasiliensis*

10 mg da mistura de ácidos graxos esterificados com solução de diazometano foram diluídos com diclorometano e avolumados para 10 mL em balão volumétrico. A partir desta solução estoque, foram preparadas soluções nas concentrações de 300, 350 e 400 µg mL⁻¹ e a cada uma foi adicionado o padrão interno (*n*-heptadecanoato de metila) e o miristato de metila, de modo que a concentração final fosse de 50 e 60 µg mL⁻¹, respectivamente. Cada solução foi injetada em triplicata no CG-DIC.

Obtenção dos adutos com dissulfeto de dimetila

A uma alíquota da fração ácida de *C. brasiliensis* (6 mg, código A1) solubilizada em hexano P.A. (0,4 mL) foi adicionado dissulfeto de dimetila (0,35 mL) e uma solução de iodo em éter etílico (0,015 g de iodo em 0,3 mL de éter etílico). A reação foi mantida sob agitação por 20 h a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi diluído em 0,5 mL de hexano e o iodo removido por adição de 1 mL de uma solução aquosa de Na₂S₂O₃ (50%, p/v). A fase orgânica foi separada e concentrada sob pressão reduzida até 0,5 mL e 2 µL foram imediatamente analisados por CG-EM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação do teor dos ácidos graxos ciclopentênicos no óleo de sapucainha

O material saponificado e neutralizado com solução aquosa de HCl foi analisado por IV e RMN ¹H e ¹³C, confirmando a presença dos ácidos chaulmúgrico, hidnocárpico e górlico, de acordo com a composição química já descrita para o óleo da chaulmugra brasileira.^{17,29} O cromatograma de íons totais do óleo esterificado com diazometano pode ser visto na Figura 3.

A posição da ligação dupla em Δ6 na cadeia lateral do ácido górlico foi confirmada pela síntese do aduto com dissulfeto de dimetila após sua esterificação com diazometano. Por CG-EM (impacto de elétrons, 70 eV) observou-se a formação dos íons de *m/z* 175 e 211, característicos da inserção de 2 unidades de -SCH₃ na ligação dupla, que podem ser vistos na Figura 4.³⁰

Ocorre também a formação do aduto com dissulfeto de metila na ligação dupla no anel ciclopentênico. Assim, formam-se 3 grupos de adutos - na cadeia lateral, no anel e na cadeia lateral e no anel - ao mesmo tempo.

A análise por CG-EM permitiu observar a presença de diversos constituintes minoritários tendo o íon de *m/z* 67 como pico base

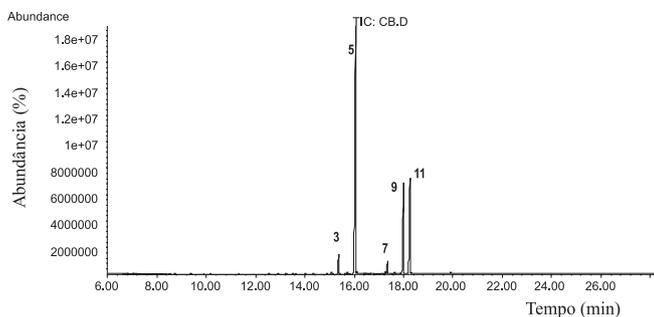


Figura 3. Cromatograma de íons totais das substâncias presentes no óleo das sementes de *C. brasiliensis* esterificado com solução de diazometano em éter etílico (estão numeradas somente as substâncias majoritárias). A numeração dos picos se refere à Tabela 1

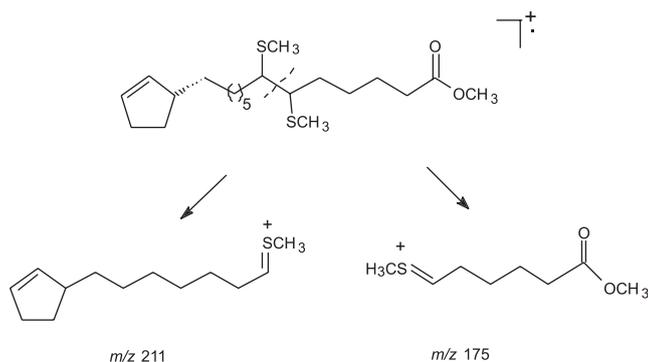
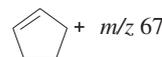


Figura 4. Íons formados por CG-EM a partir da derivatização do ácido górlico com dissulfeto de dimetila

do espectro, característico do cátion ciclopentenila, o que levou a propor a presença de ácidos ciclopentênicos de 13 a 21 átomos de carbono, ímpares, saturados e insaturados, que foram tentativamente identificados como sendo os ésteres metílicos dos ácidos aleprílico, aléprico, monoáico, oncóbico e hormélico (Tabela 1). Os dois pri-

meiros já haviam sido descritos nesta espécie por Cole e Cardoso³¹ e os outros foram encontrados no óleo e no extrato das folhas das espécies *C. echinata* e *H. anthelmintica* (Flacourtiaceae).³² O íon de m/z 74, oriundo do rearranjo de McLafferty e característico de ésteres metílicos de ácidos graxos, é formado com baixa abundância relativa nos ésteres ciclopentênicos.



A Tabela 2 mostra os dados relativos à curva analítica para o padrão elaidato de metila, que foi utilizado em substituição aos ácidos ciclopentênicos pela indisponibilidade dos mesmos, levando em consideração as semelhanças estruturais entre estas substâncias. A determinação da concentração dos ésteres metílicos ciclopentênicos na mistura do óleo da chaulmugra brasileira, a partir da co-injeção com o padrão nas amostras de 300, 350 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (soluções 1, 2 e 3, respectivamente, Tabela 3), foi realizada empregando a expressão matemática da curva analítica $Y=1,0978X-0,0189$, sendo $Y=Aa/Api$ e $X=Ca/Cpi$ (Aa = área do composto alvo; Api =área do padrão interno; Ca =concentração do composto alvo e Cpi =concentração do padrão interno).

Da mesma forma, foi escolhido como padrão interno o *n*-heptadecanoato de metila que apresentou tempo de retenção próximo aos compostos de interesse, e que não coeluiu com outros constituintes da matriz. A partir da curva analítica, obtida por regressão linear dos dados dos gráficos das áreas (área do composto alvo/área do padrão) e concentrações (concentração do composto alvo/concentração do padrão), foi determinado o fator de resposta (FR) do padrão elaidato de metila em relação ao padrão interno *n*-heptadecanoato de metila.

A recuperação do padrão de miristato de metila utilizado para avaliar possíveis perdas no processo de derivatização e durante a cromatografia indicou uma boa recuperação do material.

Segundo Abdel-Moety, a composição dos ácidos ciclopentênicos pode atingir cerca de 90% dos ácidos graxos nos diferentes óleos de chaulmugra.⁴ A metodologia desenvolvida neste trabalho, empregando a fração ácida do óleo saponificado de *C. brasiliensis*, revelou composição semelhante (88%). Estudos realizados por Spener e Mangold³² mostraram que a proporção dos ácidos ciclopentênicos

Tabela 1. Substâncias identificadas por CG-EM na fração ácida do óleo das sementes de *C. brasiliensis* (óleo da sapucainha) após derivatização com solução de diazometano

Nº. pico	T _r (min)	Ésteres metílicos	Fórmula Molecular	m/z (abundância relativa)
1	10,18	ácido aleprílico	C ₁₃ O ₂ H ₂₂	67 (100), 82 (22), 179 (4), 210 (5)
2	13,26	ácido aléprico	C ₁₅ O ₂ H ₂₆	67 (100), 82 (15), 207 (9), 238 (5)
3	15,36	ácido palmítico	C ₁₇ O ₂ H ₃₄	74 (100), 87 (77), 239 (17), 270 (27)
4	15,72	ácido monoáico	C ₁₇ O ₂ H ₂₈	67 (100), 80 (27), 233 (2), 264 (1)
5	16,04	ácido hidnocárpico	C ₁₇ O ₂ H ₃₀	67 (100), 82 (25), 235 (7), 266 (5)
6	16,09	n.i.	C ₁₇ O ₂ H ₂₈	67 (7), 80 (100), 93 (30), 264 (10)
7	17,33	ácido oléico	C ₁₉ O ₂ H ₃₆	55 (100), 74 (73), 264 (70), 296 (11)
8	17,61	ácido esteárico	C ₁₉ O ₂ H ₃₈	74 (100), 87 (67), 255 (32), 298 (29)
9	17,99	ácido górlico	C ₁₉ O ₂ H ₃₂	67 (100), 80 (48), 261 (2), 292 (5)
10	18,04	n.i.	C ₁₉ O ₂ H ₃₀	67 (6), 80 (100), 93 (32), 290 (10)
11	18,25	ácido chaulmúgrico	C ₁₉ O ₂ H ₃₄	67 (100), 82 (48), 263 (6), 294 (4)
12	18,31	n.i.	C ₁₉ O ₂ H ₃₂	67 (6), 80 (100), 93 (32), 292 (11)
13	19,92	ácido oncóbico	C ₂₁ O ₂ H ₃₆	67 (100), 80 (34), 290 (1), 320 (5)
14	20,10	ácido hormélico	C ₂₁ O ₂ H ₃₈	67 (100), 82 (35), 291 (5), 322 (3)

n.i.- substância não identificada

Tabela 2. Dados da curva analítica do padrão elaidato de metila

Concentração (µg mL ⁻¹)	Y médio	n	CV	X (Ct/Cis)	FR
1	0,022	3	17,0	0,02	1,116
25	0,531	3	1,7	0,5	1,062
50	1,088	3	1,2	1	1,088
100	2,131	3	9,4	2	1,065
250	5,486	3	6,2	5	1,097

Aa= Área do composto alvo

Api= Área do padrão interno

Ca= Concentração do composto alvo

Cpi= Concentração do padrão interno

Y= Aa/Api

X= Ca/Cpi

FR= Fator de resposta = Y/X

n= Número de replicatas

CV (%)= Coeficiente de variação = 100 X desvio padrão/média*

*O aplicativo excell foi utilizado no cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação. Estes parâmetros podem ser calculados através das equações presentes nos trabalhos de Skoog.³³

Média do FR	1,086
Desv. Padrão FR	0,023
Desv. Padrão Rel. FR	0,021
Coef. Variação FR	2,085

está relacionada principalmente com o estágio de maturação das sementes.

Estudo da composição química do óleo de sapucainha envelhecido

Paget, Cole e Cardoso observaram alteração da composição química do óleo da sapucainha extraído de sementes envelhecidas por 1 ano. Paget relatou que o óleo envelhecido apresentava-se extremamente irritante devido à formação do que chamou de *tarry acids*, produtos da oxidação do anel ciclopentênico. Pela análise química do óleo envelhecido, foi sugerida a presença de hidróxi e ceto ácidos.^{7,15} Segundo Cole e Cardoso, estes produtos teriam origem na degradação do ácido górrico, que por ter a cadeia carbônica insaturada, seria o mais instável dentre os ácidos presentes. Estes autores destacaram ainda a presença de diácidos na mistura do óleo envelhecido.^{15,17}

Baseado nestes resultados, o óleo de sapucainha foi deixado sobre a bancada do laboratório em um frasco incolor, tampado e a temperatura ambiente por um período de 3 anos. Esta amostra foi

analisada por CG-EM e CG-DIC após esterificação com diazometano e confrontada com as análises da amostra guardada ao abrigo da luz (frasco âmbar tampado) e sob refrigeração.

Com o emprego da mesma metodologia descrita para a determinação dos teores dos ácidos no óleo fresco, foi possível verificar que ocorreu uma drástica redução na concentração dos ácidos ciclopentênicos na amostra envelhecida, como pode ser visto na Tabela 4. Além disso, foi constatado que o envase na ausência de luz, a baixa temperatura e na ausência de ar mantém a integridade dos ácidos ciclopentênicos durante o período analisado.

Na amostra envelhecida foi observada não apenas a degradação do ácido górrico, mas também dos ácidos chaulmúgrico e hidnocárpico e, em proporção bem menor, dos ácidos oléico e palmítico. Como pode ser visto na Figura 5, diversos picos passaram a ser observados no óleo envelhecido. Os constituintes majoritários possuem tempo de retenção superior ao dos ésteres metílicos dos ácidos ciclopentênicos, sugerindo aumento do peso molecular, devido a reações de oxidação.

A análise dos espectros de massas destes novos constituintes revelou a presença de diferentes famílias de compostos, que são formados durante o envelhecimento. A primeira família é representada principalmente pelos íons de *m/z* 74, 84 e 98 (pico base), a segunda pelos íons *m/z* 82 (pico base) e 95, a terceira pelos íons de *m/z* 82, 95 e 109 e a última pelos íons de *m/z* 96 (pico base) e 109 (Tabela 4).

O espectro de infravermelho da amostra envelhecida mostrou sinais de deformação axial de carbonila em 1739, 1712 e 1676 cm⁻¹, sendo que a última sugere a presença de carbonila conjugada à ligação dupla. Pôde-se observar ainda o aparecimento de uma banda de deformação axial de OH, de baixa intensidade. As bandas de deformação axial de C-O foram observadas em 1197 e 1173 cm⁻¹.

O espectro de RMN de ¹³C evidenciou o aparecimento dos carbonos sp² da cetona α,β-insaturada em 209,8 ppm sugerida pelo IV e da carbonila do éster em 174,4 ppm, além dos sinais em 129,5 e 183,4 ppm da ligação dupla conjugada. O carbono sp³ adjacente à carbonila está localizado em 35,4 ppm. Estes deslocamentos químicos estão de acordo com os apresentados por Negishi para ciclopentenonas,³⁴ sugerindo a oxidação do anel ciclopentênico.

O espectro de massas dos compostos principais da amostra do óleo envelhecido, nos tempos de retenção de 17,61 e 19,03 min, mostrou íons de *m/z* 96 e 109. Estes íons poderiam ser formados através da rota proposta na Figura 6, considerando que a presença das ciclopentenonas é apoiada pelas evidências observadas nos espectros de RMN ¹H e ¹³C e de IV. Os íons moleculares destas substâncias são de *m/z* 280 e 308, respectivamente ao t_R citados, o que sugere que o composto relativo ao pico 15, mais abundante nesta mistura, seja formado a partir do ácido hidnocárpico (2, pico 5, Figura 5). O composto relativo ao pico 18, que possui 28 unidades de massa a mais que a substância relativa ao pico 15 seria, por sua vez, derivado do ácido chaulmúgrico (1, pico 11, Figura 5).

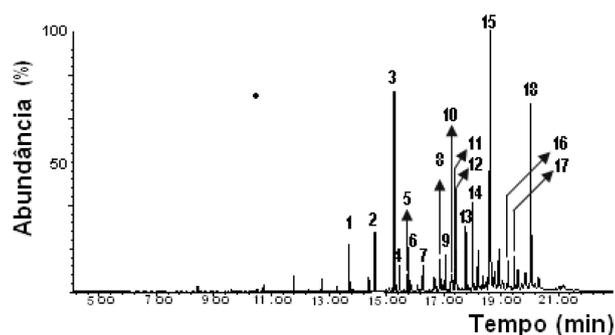
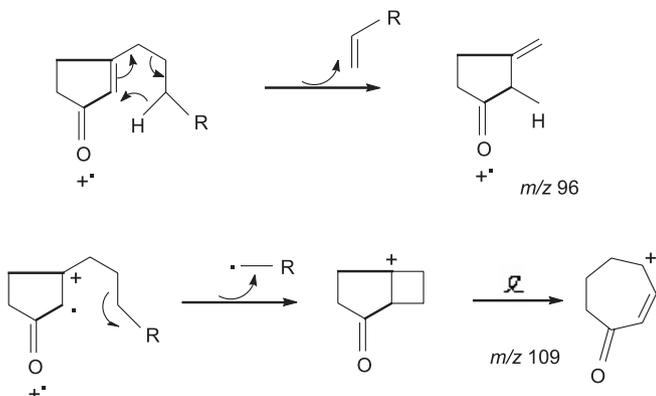
Foi possível sugerir ainda a presença de uma série homóloga de

Tabela 3. Concentração dos constituintes majoritários presentes nas amostras 1, 2 e 3 contendo ésteres metílicos derivados da mistura de ácidos graxos presentes no óleo da semente de *C. brasiliensis* (óleo da sapucainha) nas concentrações de 300, 350 e 400 µg mL⁻¹, respectivamente

Éster metílico	Amostra 1 (µg mL ⁻¹ e área relativa)	Amostra 2 (µg mL ⁻¹ e área relativa)	Amostra 3 (µg mL ⁻¹ e área relativa)
palmitato de metila	19,5 (6,5%)	22,8 (6,5%)	26,8 (6,7%)
hidnocarpato de metila	149,7 (49,9%)	177,1 (50,6%)	207,6 (51,9%)
oleato de metila	11,1 (3,7%)	12,6 (3,6%)	14,4 (3,6%)
gorlato de metila	52,2 (17,4%)	62,65 (17,9%)	72,8 (18,2%)
chaulmugrato de metila	55,8 (18,6%)	67,2 (19,2%)	78,0 (19,5%)
miristato de metila (% recuperação)	49,3 (98,6%)	50,2 (100,5%)	52,4 (104,9%)

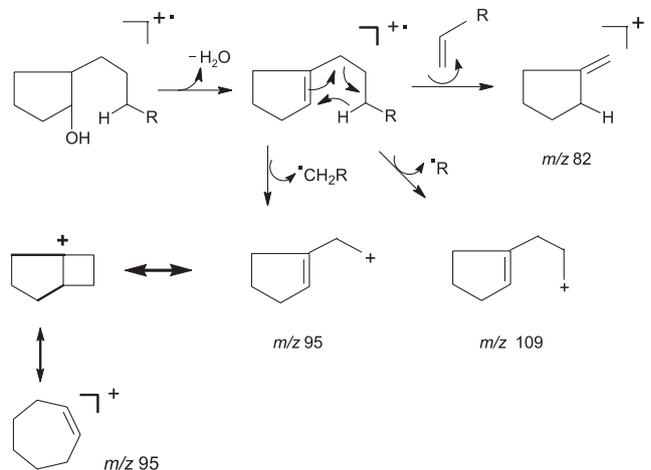
Tabela 4. Íons mais abundantes oriundos da fragmentação das substâncias majoritárias do óleo da sapucainha envelhecido

No. pico	m/z (abundância relativa)
1	55(89), 74(89), 84(55), 98(100), 244(1)
2	55(71), 74(73), 84(50), 98(100), 258(1)
3	74(100), 87(77), 239(17), 270(27)
4	55(73), 74(76), 84(50), 98(100), 272(1)
5	67(100), 82(23), 235 (8), 266(5).
6	67(7), 80(100), 93(31), 264(11)
7	55(60), 74(63), 84(43), 98(100), 286(1)
8	74(100), 87(68), 255(30), 298(29)
9	67(100), 80(46), 261(2), 292(6).
10	67(6), 80(100), 93(33), 290(11)
11	67(100), 82(49), 263(6), 294(4).
12	67(5), 80(100), 93(32), 292(12)
13	55(16), 82(100), 95(22), 280(1)
14	55(41), 82(100), 95(60), 96(48), 280(1)
15	55(71), 96(99), 109(100), 249(34), 280(9)
16	55(10), 82(100), 95(14), 277(2), 308(1)
17	55(51), 82(100), 95(77), 96(52), 308(1)
18	55(51), 96(99), 109(100), 235(44), 308(5)

**Figura 5.** Cromatograma de íons totais contendo os produtos de degradação da mistura de ácidos graxos do óleo envelhecido das sementes de *C. brasiliensis*. A numeração dos picos se refere à Tabela 1**Figura 6.** Rota de fragmentação proposta para a formação dos íons principais observados nos compostos majoritários do óleo de chaulmoogra envelhecido

ésteres metílicos de ácidos dicarboxílicos na faixa de 11 a 14 átomos de carbono (picos 1, 2, 4 e 7, Figura 5), derivados da oxidação dos ácidos ciclopentênicos. Estes espectros de massas foram comparados aos da espectroteca Wiley 275, o que levou à sugestão dos derivados dos ácidos undecanóico (pico 1), dodecanóico (pico 2), tridecanóico (pico 4) e tetradecanóico (pico 7).

Os íons de m/z 82, 95 e 109 novamente foram associados aos produtos de oxidação do anel ciclopentenila. Diversos precursores poderiam estar atrelados com a formação destes íons, como epóxidos e álcoois, que seriam originados como uma mistura complexa de diastereoisômeros. A Figura 7 apresenta uma proposta para a formação destes íons a partir do álcool alílico ciclopentênico.

**Figura 7.** Proposta para a formação dos íons de m/z 96 e 109 observados no cromatograma de íons totais do óleo de chaulmoogra envelhecido

CONCLUSÃO

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foi empregada com eficiência na investigação da composição química do óleo da sapucainha fresco e envelhecido. Foi desenvolvida uma metodologia de quantificação por CGAR empregando *n*-heptadecanoato de metila como padrão interno e, pela associação das duas técnicas, foi demonstrado que o óleo de sapucainha se degrada quando deixado envelhecer a temperatura ambiente e na presença de luz. Seus principais produtos de degradação decorrem da oxidação do anel ciclopentênico.

REFERÊNCIAS

1. Corrêa, M. P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. II.
2. Hutchinson, J.; *The Genera of Flowering Plants*, Clarendon Press: Oxford, 1967.
3. Araújo, M. G.; *An. Bras. Dermatol.* **2005**, *80*, 199.
4. Abdel-Moety, V. E. M.; *Fett. Wiss. Technol.* **1981**, *2*, 65.
5. Santos, N. P.; Pinto, A. C.; Alencastro, R. B.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 666.
6. Da Silva, R. A. D.; *Rev. Bras. Med. Farm.* **1926**, *2*, 627.
7. Power, F. B.; Gornall, F. H.; *J. Chem. Soc.* **1904**, 838.
8. Power, F. B.; Barrowcliff, M.; *J. Chem. Soc.* **1905**, 884.
9. Power, F. B.; Barrowcliff, M.; *J. Chem. Soc.* **1907**, 557.
10. Seabra, P.; *Coletânea dos Principais Trabalhos de Paulo Seabra em 25 Anos de Farmacêutico. A Chaulmoogra Brasileira. Conferência durante a Semana da Lepra em 1929*, Editora J. R. De Oliveira & Cia: Rio de Janeiro, 1940.

11. Jacobsen, P. L.; Herman, N. G.; Levy, L.; *Am. Rev. Respir. Dis.* **1973**, 107, 1022.
12. Levy, L.; *Am. Rev. Respir. Dis.* **1975**, 111, 703.
13. Shriner, R. L.; Adams, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, 47, 2727.
14. Andre, E.; Jouatte, D.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1928**, 43, 347 *apud* Cole, H. I.; Cardoso, H. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 612.
15. Paget, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, 3, 125.
16. Cole, H. I.; Cardoso, H. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1938a**, 60, 612.
17. Cole, H. I.; Cardoso, H. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1938b**, 60, 614.
18. Cole, H. I.; Cardoso, H. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1938c**, 60, 617.
19. Possolo, H.; *As Flacourtiáceas Antilepróticas*, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo: São Paulo, 1945.
20. Perkins, G. A.; Cruz, A. O.; *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, 49, 1070.
21. Stanley, W. M.; Adams, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, 51, 1515.
22. Bokil, W. V.; Nargund, K. S.; *Proc. Ind. Acad. Sci.* **1941**, 13A, 233 *apud* Lopes, L. N.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1982.
23. Diasper, D. G. M.; Smith, J. C.; *Biochem. J.* **1948**, 42, 581 *apud* Lopes, L. N.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1982.
24. Mislow, K.; Steinberg, I. V.; *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 3807.
25. Barreiro, E. J.; Gomes, L. N. L. F.; *An. Assoc. Bras. Quim.* **1982**, 33, 115.
26. Lima, J. A.; Oliveira, A. S.; Miranda, A. L. P.; Rezende, C. M.; Pinto, A. C.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2005**, 38, 1095.
27. Eder, K.; *J. Chromatogr. B* **1995**, 671, 113.
28. Vogel, A. I.; Tatchell, A. R.; Furnis, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Wiley: New York, 1996.
29. Blaise, P.; Farines, M.; Soulier, J.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, 6, 74.
30. Buser, H. R.; *Anal. Chem.* **1983**, 55, 818.
31. Cole, H. I.; Cardoso, H. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61, 2349.
32. Spener, F.; Mangold, H. K.; *Biochem.* **1974**, 13, 2241.
33. Skoog, D.; *Princípios de Análise Instrumental*, Bookman: Porto Alegre, 2002.
34. Negish, E.; Amanfu, J.; Copéret, C.; Miller, J. A.; Tour, J. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5919.