

Estudo metabolômico de óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) da Amazônia por UHPLC-MS/MS e Molecular Networking

Vitor H. G. Murakami (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eduardo J. Pilau (Orientador), e-mail: ra114945@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Química/ Maringá, PR.
Centro de Ciências Exatas e da Terra/Maringá, PR

Química e Química analítica

Palavras-chave: *Copaifera*, Cromatografia, metabólitos.

Resumo

O gênero *Copaifera* pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae e compreende diversas espécies de elevado valor econômico e ecológico. A óleo-resina chamado de “óleo de copaíba” é constituído por compostos voláteis e resinosos, sendo amplamente utilizado na medicina popular como antisséptico, antitumoral, anti-inflamatório, bactericida, no tratamento das vias respiratórias e como cicatrizante. Neste projeto a caracterização de ácidos diterpênicos como o ácido copálico e o kaurenóico foi obtida, aos quais, demonstram princípios farmacológicos e anticancerígenos, assim de grande importância e de forma com que a quantidade de material a respeito da *Copaíba reticulata* cresça.

Introdução

Popularmente conhecidas como copaibeiras, pau d’óleo, copaíba, cupiúva, copal, podoi maram e marimari, embora atualmente sejam descritas 72 espécies de *Copaifera*, apenas 17 apresentam registros na literatura sobre seus estudos químicos (*Copaifera* sp) (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O óleo-resina de copaíba é composta basicamente de uma solução de ácidos diterpênicos em uma fração volátil (óleo essencial) constituída predominantemente por sesquiterpenos (CASCON; GILBERT, 2000).

A variação na composição química da óleo-resina de copaíba está relacionada a fatores bióticos externos, dentre eles o ataque provocado por insetos ou fungos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Há um grande interesse na exploração desse recurso florestal pela indústria de cosméticos e farmacêutica, devido suas propriedades curativas e grande disponibilidade. Conforme ocorre um aumento expressivo na demanda deste produto, há a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos para o controle desse insumo, como já relatado em diversos estudos científicos.

A presente proposta tem como objetivo caracterizar as composições químicas de diferentes óleo-resinas de copaíba coletadas na Amazonia, utilizando cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC- MS/MS) e a ferramenta de *Molecular Networking*.

Materiais e métodos

A) Amostra de óleo-resinas

As amostras de óleo-resinas foram fornecidas pelo Prof Dr Wilker Caetano, do departamento de Química da UEM. As amostras foram coletadas da região Amazônica, Brasil.

B) Preparo das Amostras

As amostras de óleo-resinas foram submetidas a um processo de partição por uma separação bifásica utilizado éter etílico e água, conforme modelo adaptado de (ÇIÇEK; PFEIFER BARBOSA; GIRRESER, 2018). Posteriormente a fase aquosa e orgânica previamente separadas e solubilizadas em metanol grau HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e filtradas através de um filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm Merck Millipore, roto-evaporadas e armazenadas sob refrigeração.

C) Análise metabolômica não direcionada

Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Nexera X2) acoplado a uma massa de tempo de voo quadrupolo espectrômetro (Bruker, Impact II UHR-QTOF) controlado pelo Pacotes de software Otof Control e Hystar (Bruker Daltonics) e equipado com uma fonte de Electrospray operando em ionização em modo positivo, os espectros de varredura completa de MS (m/z 100–1300) foram adquiridos e os íons de interesse selecionados por fragmentação automática de varredura de MS/MS.

A separação cromatográfica foi realizada com uma mistura de gradiente dos solventes A (H₂O/ácido fórmico a 0,1%, v/v) e B (acetonitrila ou metanol) usando um Coluna C18 (1,7 µm, 2,1 × 100 mm). A coluna será mantida a 40 °C, com uma vazão de 0,2 mL min⁻¹.

As separações foram otimizadas de acordo com as características das amostras, utilizando sistema de gradiente de solvente. A solução de formiato de sódio foi utilizada como calibrante no início de cada corrida cromatográfica.

Resultados e Discussão

Os ácidos diterpênicos fazem parte da composição química da óleo-resina e são metabólitos secundários e produzidos naturalmente por vegetais e encontrados em óleos extraídos dos mesmos, tais possuem diferentes características terapêuticas e seus estudos são fundamentais para ter conhecimento de sua composição química e posteriormente seus efeitos no organismo e estão diretamente relacionados a fatores externos.

O ácido Kaurenóico (Figura 1) estudado na óleo-resina no qual estudos recentes demonstram uma atividade anticancerígena, anti-HIV e anti-Alzheimer demonstradas pelo ácido e seus derivados (MORESCU. O, 2020) (Figura 1). Um grande número de diterpenos tem mostrado capacidade de modular o processo inflamatório inibindo a atividade do fator nuclear kappa (NF-kappaB) (CASTRILLO *et al.*, 2001). Foi analisado por meio cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Nexera X2) e demonstrou estar presente com sua razão massa carga 301.2162 aferindo a presença do diterpeno na fração da óleo-resina.

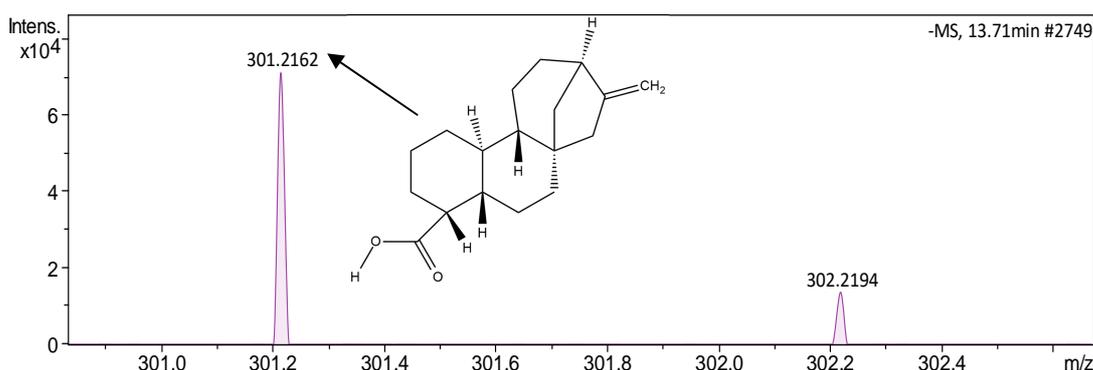


Figura 1: Espetro Ms do ácido kaurenóico, proveniente da AI - 0,1656 (Em metanol) 100%. O íon com m/z 301.2162 foi indentificado como [M-H]⁻ com 0 ppm de erro de massa.

O ácido kaurenóico, possui um importante princípio ativo farmacológico, sendo um importante anti-inflamatório e cicatrizante, nos últimos anos vem surgindo estudos com os efeitos em doenças patogênicas e avaliando sua capacidade bactericida e sua efetividade na regeneração celular. Outros terpenos obtidos foram o ácido catívico e o ácido acetoxi-copálico, outros metabólicos que são terpenos e responsáveis por diversas atividades terapêuticas (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

Da mesma forma se foi analisado do ácido copálico (Figura 2), afim de aferir sua presença, pois tem uma abundância muito maior que os outros ácidos diterpenos e o mais eficaz em diminuir a quantidade de células cancerígenas, tendo assim um enorme potencial farmacêutico e utilização em remédios anticancerígenos (NETHRIE D. IDIPPILY, 2017).

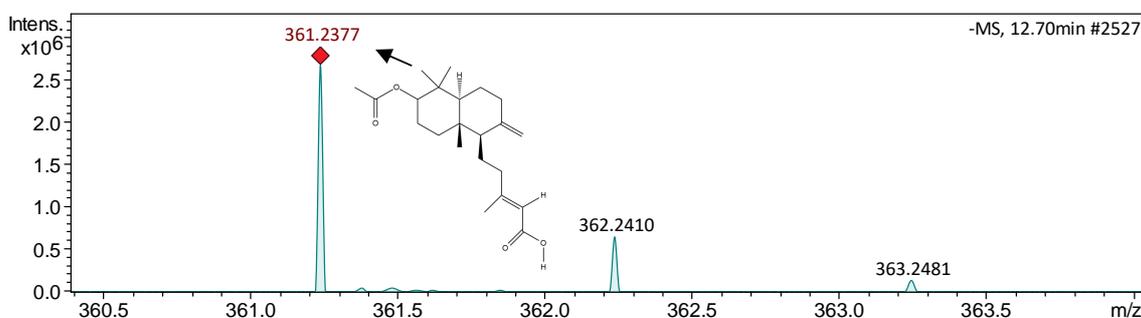


Figura 2: Espetro Ms do ácido acetóxi-copálico, proveniente da AI - 0,1656 (Em metanol) 100%. O íon com m/z 361.2377 foi indentificado como [M-H]⁻ com 1.10 ppm de erro de massa.

Podemos aferir um acréscimo na intensidade do sinal, isso pode variar de acordo com o grau de ionização ou a presença da molécula, para dados mais precisos precisaríamos de um padrão do ácido para ser possível uma análise quantitativa e se avaliar a presença do mesmo.

Conclusões

A caracterização de metabólitos presentes no óleo-resina copaíba é de extrema importância apesar de possuir uma literatura extensa ainda poucas referências destacam o estudo de seus óleos resinas. O diterpenos caracterizados nesse projeto agregam o referencial teórico a respeito da óleo-resina buscando características químicas importantes para o desenvolvimento de possíveis remédios para tratamentos anticancerígenos e anti-inflamatórios. Dessa forma o projeto se torna de grande importância para a análise, caracterização e obtenção de dados para se explorar de forma química a composição da óleo-resina de *Copaíba reticulata*.

Agradecimentos

UEM/DQI, PIBIC/CNPq.

Referências

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C. O gênero copaifera L. **Química nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, v. 55, n. 7, p. 773–778, dez. 2000.

TAPPIN, M. R. R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236–240, 26 abr. 2004.

CASTRILLO, A. Inhibition of the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF-kappa B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* 276, 15854-15860, 2001..

NETHRIE D. IDIPPILY. Copalic acid analogs down-regulate androgen receptor and inhibit small chaperone protein. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V.27, n 11, p, 2292-2295, 2017.