



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
SISTEMA DE BIBLIOTECAS DA UNICAMP
REPOSITÓRIO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E INTELLECTUAL DA UNICAMP

Versão do arquivo anexado / Version of attached file:

Versão do Editor / Published Version

Mais informações no site da editora / Further information on publisher's website:

http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=6452

DOI: 10.5935/0100-4042.20160096

Direitos autorais / Publisher's copyright statement:

©2016 by Sociedade Brasileira de Química. All rights reserved.

DIRETORIA DE TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

Cidade Universitária Zeferino Vaz Barão Geraldo

CEP 13083-970 – Campinas SP

Fone: (19) 3521-6493

<http://www.repositorio.unicamp.br>

RECUPERAÇÃO DE SESQUITERPENOS DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA A PARTIR DA DESTILAÇÃO MOLECULAR**Cleyson de S. Galúcio^{a,*}, Cibelem I. Benites^a, Rodney A. F. Rodrigues^b e Maria Regina Wolf Maciel^a**^aFaculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-852 Campinas – SP, Brasil^bCentro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, 13081-970 Paulínia – SP, Brasil

Recebido em 18/11/2015; aceito em 28/03/2016; publicado na web em 06/06/2016

SESQUITERPENES RECOVERY OF COPAIBA OIL-RESIN FROM MOLECULAR DISTILLATION. Copaiba oil-resin has aromatic characteristics and pharmacological activities attributed to sesquiterpenes compounds. These purified compounds present application in perfume, pharmaceutical and cosmetic industries. Therefore, the objective of this work was to use molecular distillation to recover and purify sesquiterpenes of the copaiba oil-resin with purity high. The parameters evaporator temperature (TEV) from 45 to 100 °C and feed flow rate (Q) between 15 and 30 ml min⁻¹ were evaluated through design of experiments (2² with center points). The results showed that it was possible to recover sesquiterpenes with 98.12% purity in the distillate stream. Increased in TEV and reduction in Q were the effects observed experimentally and through the response surface. The best experimental condition was TEV of 100 °C and Q of 15 mL min⁻¹. Color differences were noticed between distillate streams (colorless) and residue (brown). These can be used as parameters for separation of sesquiterpenes and diterpenes. The molecular distillation proved to be an efficient process to both recovery and purification of sesquiterpenes from the copaiba oil-resin.

Keywords: short path; *Copaifera* genus; sesquiterpenes purification; bioactive compounds.**INTRODUÇÃO**

O óleo-resina de copaíba pode ser extraído sustentavelmente a partir do tronco das árvores do gênero *Copaifera*. Este é constituído de sesquiterpenos (óleo essencial) e diterpenos (resina) que apresentam variações no teor mesmo sendo da mesma espécie. Entretanto, alguns destes compostos ocorrem com mais frequência e apresentam comprovada propriedade medicinal. Dentre eles, o β-cariofileno é o sesquiterpeno mais comum e destaca-se por sua atividade anti-inflamatória. Para o óleo essencial de copaíba também se reporta a atividade antifúngica e antipiorfase.¹⁻⁵

Um das características observadas para o óleo-resina é a variação de cor. De acordo com Rigamonte-Azevedo *et al.*,⁶ estes podem apresentar-se incolor, amarelo claro, amarelo médio, amarelo dourado e acastanhado. Os motivos podem ser fatores sazonais e ambientais. Diferenças no conteúdo de óleo essencial e resina também são apontadas como responsáveis nas mudanças de cor no óleo-resina de copaíba. Amostras com maior teor de óleos essenciais apresentam coloração mais clara. A confirmação destas características é muito importante e as análises cromatográficas estão entre as técnicas analíticas mais eficientes para determinação da composição dos terpenos do óleo-resina de copaíba. Geralmente, estes são identificados por meio da combinação de duas técnicas cromatográficas: cromatografia em fase gasosa equipada com detector seletivo de massas (GC-MS) e cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID).^{2,7}

O método comumente empregado para a obtenção do óleo essencial é a hidrodestilação.^{8,9} Este método caracteriza-se por ser um procedimento simples e de baixo custo. Porém, a exposição do óleo essencial a um longo período de extração sob altas temperaturas é uma desvantagem deste processo, interferindo na qualidade do produto.¹⁰ Como alternativa para estes compostos termossensíveis, destaca-se a destilação molecular.¹¹

A destilação molecular é um processo que permite a separação de compostos por meio de um sistema de evaporação e condensação sob alto vácuo (1,0x10⁻³ mbar). Deste modo, permite que compostos termossensíveis sejam separados com baixas temperaturas e curto tempo de residência (entre 1 a 10 s). As moléculas evaporadas atingem o condensador facilmente o que é explicado pelo livre percurso médio das moléculas que é menor que a distância entre o evaporador e o condensador.¹²⁻¹⁴

A aplicação da destilação molecular pode ser evidenciada na obtenção de diferentes produtos a partir de óleos vegetais e óleos essenciais. Para produtos obtidos a partir de óleos vegetais cita-se a destilação molecular para a recuperação de tocoferóis,¹⁵ concentração de monoacilgliceróis e diacilgliceróis de óleos vegetais.¹⁶ No tocante aos óleos essenciais, cita-se a concentração de citral do óleo essencial de capim limão,¹⁷ o fracionamento do óleo de laranja¹⁸ e do óleo essencial de orégano.¹⁹

Portanto, a destilação molecular mostra-se uma alternativa vantajosa para a purificação de produtos com alto valor agregado, podendo ser empregada para diferentes materiais, inclusive para materiais termossensíveis como os óleos essenciais. No processo de destilação molecular os compostos mais voláteis, como os sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba, são separados na corrente de destilado. Entretanto, uma parcela destes voláteis é obtida na corrente de resíduo. Assim, o objetivo deste trabalho foi empregar a destilação molecular para recuperar e purificar sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba na corrente de destilado.

PARTE EXPERIMENTAL**Matéria-prima**

A matéria-prima submetida ao processo de destilação molecular foi o óleo-resina de *Copaifera officinalis* (Jacq.) L. (CAS Number: 8001-61-4), adquirido da empresa FERQUIMA-SP, BRASIL, lote: 155, dezembro/2011. Este trabalho apresenta autorização para o

*e-mail: cs.galucio@gmail.com

estudo do óleo-resina de copaíba (SISBIO, número: 32800-1) e acesso a patrimônio genético (CGEN, processo: 010789/2014-6), aprovado em 12/11/2014.

Destilação molecular

O equipamento utilizado neste trabalho foi o Destilador Molecular de Filme Descendente modelo KDL 5, UIC-GmbH (Alzenau-hörstein Germany). A distância entre o evaporador e o condensador é de 0,02 m. A área de superfície do evaporador é de 0,048 m² e a área de superfície do condensador de 0,065 m². O esquema do sistema de separação deste equipamento é apresentado na Figura 1. Este dispõe de evaporador (1) de forma cilíndrica e encamisada para a circulação do fluido responsável pelo aquecimento. Na parte interna, possui um condensador (2) que fica localizado no centro do equipamento e um prato giratório (3) que faz o espalhamento da amostra. Na parte inferior é constituída da correntes de saída (destilado e resíduo). Os compostos com maior massa molar ou que não evaporaram são obtidos na corrente de resíduo (4). Os compostos com menor massa molar (voláteis), que evaporam, atingem o condensador e são obtidos na corrente de destilado (5).

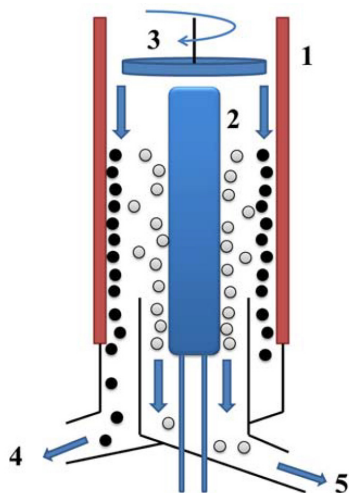


Figura 1. Esquema do sistema de separação do destilador molecular de filme descendente: 1) evaporador; 2) condensador; 3) disco giratório; 4) corrente de resíduo; 5) corrente de destilado

Os fatores temperatura do evaporador (TEV) e vazão de alimentação (Q) são fundamentais na separação de compostos e por isso foram avaliados na destilação molecular do óleo-resina de copaíba. As condições experimentais foram definidas a partir de um estudo preliminar. A matriz de planejamento experimental (Tabela 1) foi estabelecida de acordo Barros Neto *et al.*,²⁰ sendo um fatorial do tipo 2² com três pontos centrais. O software Statistica 7.0^{®21} foi utilizado para analisar as condições de estudo.

Para a condução dos experimentos foi mantida a temperatura do condensador de 10 °C, pressão de 1,0x10⁻³ mbar, alimentação à temperatura ambiente (≈ 25 °C) e velocidade do disco giratório para

o espalhamento da amostra em 350 rpm. O *trap* foi sempre mantido com nitrogênio líquido para proteger o sistema de bombas dos compostos voláteis. As corridas foram realizadas por 5 minutos, contados a partir do momento que foram observadas correntes de destilado e resíduo, ou seja, separação das frações.

O cálculo para a recuperação de sesquiterpenos na corrente de destilado (RSD) (Equação 1) foi realizado de acordo com apresentado por Martins *et al.*,²² onde *sesq* corresponde aos compostos sesquiterpênicos.

$$RSD (\%) = \left(\frac{\text{Massa da corrente (g)} \times \text{fração de sesq na corrente}}{\text{Massa da matéria-prima (g)} \times \text{fração de sesq na matéria-prima}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Todas as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente (≈ 25 °C) em frascos envolvidos com papel alumínio devido a sua sensibilidade à luz. Uma parte destas amostras foi transferida para frascos âmbar e conservadas a -10 °C até o momento das amostras serem analisadas por cromatografia em fase gasosa (5 dias após o fracionamento).

Identificação de terpenos

O óleo-resina de copaíba e as correntes de destilado e resíduo foram submetidas à metilação para a identificação dos diterpenos. Para esta reação o diazometano é o mais utilizado, realizando metilação direta.²³ Devido à carência do diazometano, o reagente (trimetilsilil) diazometano (TMSD), solução 2 mol L⁻¹ em hexano da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), também foi utilizado e as condições de reação foram estabelecida de acordo com Migowska *et al.*²⁴ Para esta reação adicionou-se 2 mL de uma solução de 10% de metanol em acetona para aproximadamente 10 mg das amostras em frascos de vidros. As amostras foram homogeneizadas e em seguida adicionou-se 50 µL de TMSD utilizando uma microseringa. A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida evaporou-se todo o reagente. As amostras foram solubilizadas em acetato de etila (10 mL) e uma alíquota de 1,5 mL foi transferida para os vials para posterior injeção no cromatógrafo.

A análise para identificação dos terpenos e o seu teor foi realizada no Cromatógrafo à Gás equipado com detector seletivo de massas (2850 Centerville Rd, Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA), operando no modo impacto de elétrons (70 eV). Para a confirmação do teor dos terpenos foi utilizado Cromatógrafo à Gás com detector de ionização de chama (20900 Rodano, Thermo Fisher Scientific S.p.a., Strada Rivoltana, Milan, Italy). As condições para os dois equipamentos foram: Coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm diâmetro). O injetor operou no modo Split com razão 1:40, injetor: 220 °C. O programa de aquecimento da coluna foi de 60 °C a 240 °C (3 °C min⁻¹). Foi utilizado o gás hélio a 1 mL min⁻¹. O volume de amostra injetada nos equipamentos foi de 1 µL.

A identificação dos sesquiterpenos foi realizada através do cálculo do Índice de Retenção (IR) e comparação dos espectros obtidos nas análises com os da biblioteca NIST 05 do equipamento e com os da literatura.²⁵ Para o cálculo do IR foi utilizada uma série homologa de padrões cromatográficos de alcanos lineares (C₈-C₂₂). Os diterpenos foram identificados por comparação dos espectros de

Tabela 1. Matriz de planejamento experimental do tipo 2², valores reais e codificados (entre parênteses)

| Fatores | Ensaios | | | | | | |
|---------------------------|---------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5* | 6* | 7* |
| TEV (°C) | 45 (-1) | 100 (+1) | 45 (-1) | 100 (+1) | 75 (0) | 75 (0) | 75 (0) |
| Q (mL min ⁻¹) | 15 (-1) | 15 (-1) | 30 (+1) | 30 (+1) | 22,5 (0) | 22,5 (0) | 22,5 (0) |

*Pontos centrais; TEV = temperatura do evaporador; Q = vazão de alimentação.

massa obtidos com os existentes na biblioteca NIST 05 e com os encontrados na literatura.^{26,27} Na identificação dos constituintes por GC/MS, somente aqueles com similaridade acima de 90% foram considerados. O teor de sesquiterpenos e diterpenos são resultantes da soma dos constituintes destes compostos analisados por cromatografia em fase gasosa (GC/MS e GC/FID). Para a recuperação e purificação de sesquiterpenos na destilação molecular foi utilizado somente o teor total de sesquiterpenos e diterpenos. Somente os constituintes sesquiterpênicos foram apresentados nesta etapa, visto serem a fonte de estudo deste trabalho.

Análise visual das correntes (cor)

O óleo-resina de diferentes espécies do gênero *Copaifera* apresentam variações na cor e estas podem estar relacionadas à diferença nos constituintes terpênicos. As características de cor do óleo-resina de copaíba e das correntes de destilação molecular (destilado e resíduo) foram classificadas por comparação visual e com as estabelecidas por Rigamonte-Azevedo *et al.*⁶ Assim, a análise de cor seguiu a seguinte classificação: incolor, amarelo claro, amarelo médio, amarelo dourado e acastanhado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição de terpenos

O óleo-resina de copaíba apresentou 63,63% de sesquiterpenos e 36,38% de diterpenos (Tabela 2). Os constituintes sesquiterpênicos majoritários foram: β -cariofileno (26,32%), β -bisaboleno (9,24%), bergamoteno (5,25%), β -selineno (5,11%) e α -humuleno (3,90%). O somatório de outros sesquiterpenos corresponderam a 13,81%. Dentre os diterpenos, destaca-se o ácido poliáltico (11,69%). Os terpenos do óleo-resina de copaíba destacam-se por suas propriedades medicinais. Entretanto, os sesquiterpenos têm despertado maior interesse das indústrias de perfumaria, farmacêuticas e de cosméticos. De acordo com Leandro *et al.*,²⁸ esse interesse nos sesquiterpenos tem elevado o seu valor e o concentrado destes compostos pode chegar a 600 vezes o valor do óleo-resina. Nessa perspectiva, este trabalho propõe a concentração destes compostos por meio da destilação molecular. A composição de sesquiterpenos e o teor de diterpenos nas correntes de destilado e de resíduo são apresentados na Tabela 3 e 4, respectivamente.

Nas correntes de destilado (Tabela 3) os sesquiterpenos somaram entre 98 e 100%. O β -cariofileno foi o constituinte majoritário e detectado em todos os produtos de destilado, aumentando de 26,32% para 40-52%. Outros sesquiterpenos mais abundantes também aumentaram em relação à matéria-prima: O β -bisaboleno alcançou teor de 15,62% (ensaio 2), o bergamoteno de 9,03% (ensaio 1), o β -selineno de 7,93% (ensaio 2) e o α -humuleno de 6,34% (ensaio 1). Os parâmetros de TEV e Q não influenciaram no teor total de sesquiterpenos. Em relação aos constituintes, o β -cariofileno apresentou teor mais alto sob TEV de 45 °C (ensaios 1 e 3) do que sob TEV de 100 °C (ensaios 4 e 5). Essa redução do β -cariofileno com o aumento da TEV deve-se ao aumento percentual dos outros sesquiterpenos no destilado, sendo o principal o β -bisaboleno. Esta afirmativa pode ser comprovada na corrente de resíduo, onde o teor do β -bisaboleno não foi detectado no ensaio 2 e no ensaio 4 apresentou teor mais baixo que os dos ensaios 1 e 3.

Nas correntes de resíduo (Tabela 4) os sesquiterpenos somaram entre 0,75 - 47,64%. O β -cariofileno foi detectado em todas as correntes com teores entre 0,24 e 12,96%. Devido as correntes de resíduo serem enriquecidas de diterpenos (compostos com maior massa molar) foi necessário o aquecimento de alguns dos tubos coletores

(ensaios 2, 4, 5, 6 e 7) entre 60 e 80 °C para remoção das amostras.

Na análise de cor, utilizando a tabela de cores de Rigamonte-Azevedo *et al.*,⁵ o óleo-resina de copaíba apresentou cor acastanhada. Já nas correntes de destilado e resíduo, duas características de coloração foram predominantes (Figura 2). As correntes de destilado, ricas em sesquiterpenos, apresentaram-se incolores. Já as correntes de resíduo, ricas em diterpenos, apresentaram cor acastanhada. A cor acastanhada foi atribuída aos diterpenos e a diferença na coloração das correntes pode ser utilizada como indicador na separação dos constituintes sesquiterpênicos e diterpênicos. De acordo Silva *et al.*,²⁹ alguns compradores têm interesse no óleo-resina de copaíba que se destacam no óleo essencial e que sejam incolores ou mais claros. Assim, a destilação molecular não só permite obter óleo essencial com alta pureza como também obter este produto incolor que é de interesse comercial.

Tabela 2. Composição de terpenos do óleo-resina de copaíba

| Constituintes | TR (min) | IR* | IR | Área relativa (%) |
|-----------------------------------|----------|------|------|-------------------|
| δ -elemeno | 20,86 | 1335 | 1337 | 0,48 |
| α -copaeno | 22,51 | 1374 | 1375 | 0,70 |
| β -elemeno | 23,15 | 1389 | 1392 | 1,98 |
| cipereno | 23,40 | 1398 | 1398 | 0,28 |
| β -cariofileno | 24,34 | 1417 | 1421 | 26,33 |
| bergamoteno | 24,93 | 1432 | 1436 | 5,25 |
| α -guaiano | 25,03 | 1437 | 1438 | 0,47 |
| α -humuleno | 25,64 | 1452 | 1454 | 3,91 |
| <i>trans</i> - β -farneseno | 25,79 | 1454 | 1457 | 0,49 |
| γ -muuruleno | 26,57 | 1478 | 1477 | 0,41 |
| germacreno D | 26,74 | 1484 | 1481 | 1,72 |
| β -selineno | 26,96 | 1489 | 1486 | 5,11 |
| α -selineno | 27,30 | 1498 | 1495 | 2,93 |
| <i>cis</i> - α -bisaboleno | 27,62 | 1506 | 1503 | 0,70 |
| β -bisaboleno | 27,90 | 1505 | 1510 | 9,24 |
| γ -cadineno | 28,43 | 1522 | 1524 | 1,16 |
| Óxido-cariofileno | 30,70 | 1582 | 1583 | 0,29 |
| Σ n.i. | - | - | - | 2,18 |
| Σ sesquiterpenos (%) | | | | 63,63 |
| ácido eperúico** | 51,75 | - | - | 0,51 |
| ácido labdanico** | 52,12 | - | - | 0,56 |
| ácido catívico** | 52,66 | - | - | 2,78 |
| ácido ent-16B-caurano-19-óico** | 53,93 | - | - | 2,10 |
| ácido copálico** | 54,01 | - | - | 4,38 |
| ácido poliáltico** | 55,50 | - | - | 11,69 |
| ácido hardwickiic** | 57,39 | - | - | 0,64 |
| ácido pinifólico** | 58,14 | - | - | 4,44 |
| Σ n.i. | - | - | - | 9,28 |
| Σ diterpenos (%) | | | | 36,37 |

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção; * ADAMS, 2007; **Éster metílico.

Portanto, nas correntes de destilado o teor total dos sesquiterpenos somaram acima de 98%. O alto vácuo no sistema foi o principal responsável por estes resultados, o qual favoreceu a maior evaporação dos sesquiterpenos. Deste modo, os parâmetros de TEV e Q não influenciaram na composição destes compostos. No entanto, nem todos os sesquiterpenos presentes no óleo-resina de copaíba antes da destilação molecular foram obtidos nas correntes de destilado. Como apresentado na Tabela 4, foi observado teor total de sesquiterpenos com 47,64% (ensaio 3R). Assim, foi avaliada a recuperação

Tabela 3. Composição de sesquiterpenos e teor de diterpenos do óleo-resina de copaíba nas correntes de destilado

| Fatores | IR | Ensaio | | | | | | |
|---------------------------|------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1D | 2D | 3D | 4D | 5D | 6D | 7D |
| TEV (°C) | | 45 | 100 | 45 | 100 | 72,5 | 72,5 | 72,5 |
| Q (mL min ⁻¹) | | 15 | 15 | 30 | 30 | 22,5 | 22,5 | 22,5 |
| Componentes | IR | Área relativa (%) | | | | | | |
| δ-elemeno | 1337 | 0,90 | 0,94 | 1,60 | 0,73 | 0,76 | 0,65 | 0,75 |
| ciclosativeno | 1364 | 0,37 | - | - | 0,37 | 0,31 | - | 0,31 |
| α-copaeno | 1375 | 1,33 | 0,96 | 1,51 | 1,07 | 1,12 | 1,02 | 1,12 |
| β-elemeno | 1392 | 3,42 | 2,71 | 3,67 | 2,91 | 3,01 | 2,88 | 3,01 |
| cipereno | 1398 | 0,50 | - | 0,56 | 0,41 | 0,42 | - | 0,42 |
| β-cariofileno | 1421 | 48,33 | 40,15 | 52,08 | 40,54 | 42,13 | 43,92 | 41,52 |
| bergamoteno | 1436 | 9,03 | 8,36 | 8,95 | 8,44 | 8,74 | 8,91 | 8,65 |
| α-guaieno | 1438 | 0,80 | 0,71 | 0,81 | 0,70 | 0,74 | 0,74 | 0,71 |
| α-humuleno | 1454 | 6,34 | 6,00 | 6,16 | 6,04 | 6,17 | 6,24 | 6,07 |
| <i>trans</i> -β-farneseno | 1457 | 0,69 | 0,74 | 0,57 | 0,77 | 0,79 | 0,74 | 0,77 |
| γ-muuruleno | 1477 | 0,55 | 0,59 | - | 0,59 | 0,60 | - | 0,58 |
| germacreno D | 1481 | 2,43 | 2,60 | 2,17 | 2,62 | 2,64 | 2,76 | 2,59 |
| β-selineno | 1486 | 7,04 | 7,93 | 6,33 | 7,74 | 7,77 | 7,58 | 7,66 |
| α-selineno | 1495 | 3,86 | 4,51 | 3,43 | 4,40 | 4,41 | 4,36 | 4,33 |
| <i>cis</i> -α-bisaboleno | 1503 | 0,79 | 1,15 | 0,49 | 1,14 | 1,11 | 0,87 | 1,08 |
| β-bisaboleno | 1510 | 10,66 | 15,62 | 8,88 | 14,72 | 14,55 | 15,47 | 14,14 |
| γ-cadineno | 1524 | 1,14 | 1,85 | 0,88 | 1,75 | 1,67 | 1,62 | 1,62 |
| Germacreno B | 1556 | - | - | - | - | - | - | 0,26 |
| óxido-cariofileno | 1583 | - | - | - | 0,33 | 0,27 | - | 0,39 |
| s.n.i. | - | 1,31 | 3,32 | 0,58 | 3,79 | 2,83 | 1,32 | 4,02 |
| Σ sesquiterpenos (%) | | 99,47 | 98,12 | 98,68 | 99,06 | 100 | 99,08 | 100 |
| Σ diterpenos (%) | | 0,53 | 1,88 | 1,32 | 0,94 | 0,0 | 0,92 | 0,0 |

D= destilado; IR= índice de retenção; s.n.i.= sesquiterpenos não identificados.

Tabela 4. Composição de sesquiterpenos e teor de diterpenos do óleo-resina de copaíba na corrente de resíduo

| Fatores | IR | Ensaio | | | | | | |
|---------------------------|------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1R | 2R | 3R | 4R | 5R | 6R | 7R |
| TEV (°C) | | 45 | 100 | 45 | 100 | 72,5 | 72,5 | 72,5 |
| Q (mL min ⁻¹) | | 15 | 15 | 30 | 30 | 22,5 | 22,5 | 22,5 |
| Componentes | IR | Área relativa (%) | | | | | | |
| δ-elemeno | 1337 | 0,90 | 0,94 | 1,60 | 0,73 | 0,76 | 0,65 | 0,75 |
| α-copaeno | 1375 | - | - | 0,24 | - | - | - | - |
| β-cubebeno | 1390 | - | 0,22 | - | 0,10 | - | - | - |
| β-elemeno | 1392 | 0,63 | - | 0,92 | - | - | - | - |
| β-cariofileno | 1421 | 10,33 | 0,24 | 12,96 | 1,82 | 2,79 | 3,35 | 4,67 |
| bergamoteno | 1436 | 2,48 | - | 2,97 | 0,32 | 0,51 | 0,62 | 0,73 |
| α-guaieno | 1438 | - | - | 0,24 | - | - | - | - |
| α-humuleno | 1454 | 2,05 | - | 2,24 | 0,33 | 0,57 | 0,67 | 0,68 |
| <i>trans</i> -β-farneseno | 1457 | 0,30 | - | 0,32 | - | - | - | - |
| γ-muuruleno | 1477 | - | - | 0,40 | - | - | - | - |
| germacreno D | 1481 | 1,01 | - | 1,65 | - | 0,27 | 0,31 | 0,31 |
| β-selineno | 1486 | 3,34 | - | 5,02 | 0,43 | 0,88 | 1,01 | 1,03 |
| α-selineno | 1495 | 2,00 | - | 2,83 | 0,25 | 0,53 | 0,98 | 0,61 |
| <i>cis</i> -α-bisaboleno | 1503 | 0,56 | - | 0,80 | - | - | 0,21 | 0,15 |
| β-bisaboleno | 1510 | 7,90 | - | 10,74 | 0,67 | 2,00 | 2,81 | 2,32 |
| γ-cadineno | 1524 | 0,92 | - | 1,30 | - | 0,31 | 0,45 | 0,36 |
| óxido-cariofileno | 1583 | 0,28 | - | 0,32 | - | - | - | - |
| s.n.i. | - | 2,78 | 0,29 | 4,70 | 1,16 | 2,96 | 2,86 | 3,09 |
| Σ sesquiterpenos (%) | | 34,58 | 0,75 | 47,64 | 5,07 | 10,82 | 13,26 | 13,93 |
| Σ diterpenos (%) | | 65,43 | 99,25 | 52,37 | 94,93 | 89,18 | 86,74 | 86,07 |

R= resíduo; IR= índice de retenção; s.n.i.= sesquiterpenos não identificados.

e, conseqüentemente, purificação de sesquiterpenos para a corrente de destilado.



Figura 2. Frações da destilação molecular do óleo-resina de copaíba na corrente de destilado (a) e na corrente de resíduo (b)

Recuperação de sesquiterpenos no destilado (RSD)

A Tabela 5 apresenta as condições experimentais, massa das correntes (destilado e resíduo) e os valores para RSD. Os melhores resultados foram obtidos sob TEV de 100 °C (ensaios 2 e 4). Com o aumento da TEV para 100 °C houve maior evaporação das moléculas de sesquiterpenos e estes saíram em maior proporção na corrente de destilado. A TEV de 45 °C (ensaios 1 e 3) apresentou baixo RSD, ou seja, esta condição não foi suficiente para destilar os sesquiterpenos e esses permaneceram em grande quantidade na corrente de resíduo. Nestes ensaios, a Q de 15 mL min⁻¹ teve melhor RSD do que a Q de 30 mL min⁻¹, indicando que a vazão mais baixa favorece a recuperação destes compostos no destilado, visto que eles escoam mais lentamente propiciando a evaporação. Deste modo, a condição ótima para a recuperação e purificação de sesquiterpenos foi TEV de 100 °C e Q de 15 mL min⁻¹.

Na Tabela 6 apresentam-se os termos efeitos, erro, *t*, *p* (*p-value*), limites de confiança (-95% e +95%) dos fatores estudados. Através do nível de confiança de 95% (*p-value* < 0,05) observa-se que TEV, Q e a interação entre eles apresentam influência estatística. Estes fatores e coeficientes de regressão foram utilizados no modelo matemático para RSD (Equação 2). No cálculo realizado para obtenção do modelo foram utilizados os valores codificados do planejamento experimental.

Tabela 6. Efeitos para RSD na destilação molecular

| | Efeitos | Erro | t(2) | p | -95,% | +95,% |
|------------|---------|------|--------|------|--------|-------|
| Média | 79,44 | 0,55 | 144,33 | 0,00 | 77,07 | 81,81 |
| TEV (°C) | 53,18 | 1,46 | 36,52 | 0,00 | 46,91 | 59,44 |
| Q (mL/min) | -12,58 | 1,46 | -8,64 | 0,01 | -18,84 | -6,31 |
| TEV x Q | 9,50 | 1,46 | 6,53 | 0,02 | 3,24 | 15,77 |

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para RSD

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Média Quadrática | F _{calculado} | F _{tabelado} |
|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 3076,40 | 1 | 3076,40 | 25,54 ^a | 6,61 |
| Resíduo | 602,31 | 5 | 120,46 | | |
| Falta de ajuste | 598,07 | 3 | 199,36 | | |
| Erro puro | 4,24 | 2 | 2,12 | | |
| Total | 3678,71 | 6 | | | |

F_{calculado}/F_{tabelado} = 3,86; R² = 0,8363 (95% de confiança), ^arazão da média quadrática de regressão/resíduo.

Tabela 5. Condições experimentais, massa das correntes (destilado e resíduo) e RSD

| Ensaio | Fatores | | Massa das correntes (g) | | RSD (%) |
|--------|----------|---------------------------|-------------------------|---------|---------|
| | TEV (°C) | Q (mL min ⁻¹) | Destilado | Resíduo | |
| 1 | 45 (-1) | 15 (-1) | 24,90 | 56,55 | 55,89 |
| 2 | 100 (+1) | 15 (-1) | 48,50 | 27,86 | 99,56 |
| 3 | 45 (-1) | 30 (+1) | 30,52 | 123,80 | 33,80 |
| 4 | 100 (+1) | 30 (+1) | 90,32 | 64,24 | 96,49 |
| 5* | 72,5 (0) | 22,5 (0) | 60,20 | 49,75 | 91,79 |
| 6* | 72,5 (0) | 22,5 (0) | 67,52 | 60,09 | 89,36 |
| 7* | 72,5 (0) | 22,5 (0) | 58,65 | 51,04 | 89,19 |

*Pontos centrais; TEV= temperatura do evaporador; Q= vazão de alimentação; RSD= recuperação de sesquiterpenos no destilado.

$$RSD (\%) = 79,44 + (26,59 \times TEV) - (-6,29 \times Q) + (4,75 \times TEV \times Q) \quad (2)$$

A validação do modelo foi realizada por meio da análise de variância - ANOVA (Tabela 7). O R² de 0,8761 significa que a variação explicada pelo modelo foi de 83,63%. A máxima foi de 99,88%, sendo esta calculada a partir da diferença entre a soma dos quadrados (total e erro puro) e dividido pela soma do quadrado total. Quanto mais próximo de 100% for a variação explicada, melhor é o ajuste do modelo às respostas. O F_{calculado} tem que ser maior que o F_{tabelado} e quanto maior for a razão destes termos, mais aceitável é o modelo. A relação F_{calculado}/F_{tabelado} foi de 3,86. Deste modo, os resultados indicam que o modelo é estatisticamente significativo.

Por meio da superfície de respostas (Figura 3) obtida a partir do modelo matemático (Equação 2), pode ser observado que o aumento da TEV e a redução da Q são os efeitos responsáveis para o aumento da RSD. O efeito da Q mostra-se menor que TEV, porém é um fator importante no processo. A superfície de resposta permitiu visualizar que a TEV de 100 °C e Q de 15 mL/min correspondem as condições ótimas do processo de destilação molecular. Este resultado é satisfatório e está de acordo os dados experimentais. As condições avaliadas na destilação molecular são robustas e atenderam o objetivo desejado, que foi recuperar e purificar sesquiterpenos na corrente de destilado.

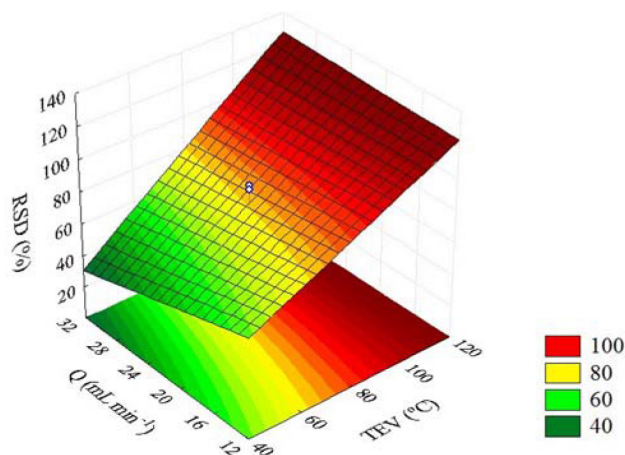


Figura 3. Superfície de resposta para a recuperação de sesquiterpenos no destilado

CONCLUSÃO

O processo de destilação molecular foi empregado pela primeira vez para a separação dos compostos do óleo-resina de copaíba. Neste estudo a melhor condição para recuperação e purificação de sesquiterpenos na corrente de destilado foi alcançada, sendo que os efeitos observados foram o aumento da TEV e a redução da Q. As melhores condições do processo foram sob pressão de $1,0 \times 10^{-3}$ mbar, TEV de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e Q de 15 mL min^{-1} . Os sesquiterpenos foram obtidos em 98,12% de pureza. O β -cariofileno, que é um dos principais constituintes bioativos encontrados no óleo-resina de copaíba, aumentou o teor para 40,15% em relação ao apresentado no material de alimentação (26,32%). As correntes de destilado foram ricas em sesquiterpenos e apresentaram-se incolores. Esta característica foi atribuída ao menor teor de diterpenos obtidos majoritariamente na corrente de resíduo. Por meio da superfície de respostas foi possível confirmar a melhor condição experimental para RSD. Os resultados obtidos nas condições avaliadas foram satisfatórios e atenderam aos objetivos deste estudo.

Portanto, através do processo de destilação molecular foi possível agregar valor ao óleo-resina de copaíba, recuperando e purificando sesquiterpenos com alta qualidade na corrente de destilado. Os sesquiterpenos purificados obtidos por destilação molecular propiciam diversificada aplicação, contudo, seu aroma agradável e por ser rico em constituintes bioativos são características de interesse das indústrias de perfumes, fármacos e cosméticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo suporte financeiro no Programa PRO-DPD/AM-BOLSAS.

REFERÊNCIAS

- Lima, S. R. M.; Veiga Junior, V. F.; Christo, H. B.; Pinto, A. C.; Fernandes P. D.; *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 1048.
- Veiga Junior, V. F.; Rosas, E. C.; Carvalho, M. V.; Henriques, M. G. M. O.; Pinto, A. C.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *112*, 248.

- Deus, R. J. A.; Alves, C. N.; Arruda, M. S. P.; *Rev. Bras. Plantas Med.* **2011**, *13*, 1.
- Gelminia, F.; Beretta, G.; Anselmi, C.; Centini, M.; Magni, P.; Ruscica, M.; Cavalchini, A.; Facino, R. M. *Int. J. Pharm.* **2013**, *440*, 170.
- Lucca, L. G.; Matos, S. P.; Borulle, B. T.; Dias, D. O.; Teixeira, H. F.; Veiga Junior, V. F.; Limberger, R. P.; Koester, L. S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *104*, 144.
- Rigamonte-Azevedo, O. C.; Wadt, P. G. S.; Wadt, L. H. O.; Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Regiane, A. M.; *Revista brasileira de oleaginosas e fibras* **2004**, *8*, 851.
- Barbosa, P. C. S.; Wiedemann, L. S. M.; Medeiros, R. S.; Sampaio, P. T. B.; Vieira, G.; Veiga Junior, V. F.; *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 1350.
- Pereira, F. J.; Martins, F. T.; Corrêa, R. S.; Moreira, M. E. C.; Costa, A. M. D. D.; Santos, M. H.; Polo, M.; Barbosa, L. C. A.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, *27*, 364.
- Souza, A. B.; Martins, C. H. G.; Souza, M. G. M.; Furtado, N. A. J. C.; Heleno, V. C. G.; Sousa, J. P. B.; Rocha, E. M. P.; Bastos, J. K.; Cunha, W. R.; Veneziani, R. C. S.; Ambrósio, S. R.; *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 215.
- Chemat, F.; Vian, M. A.; Cravotto, G.; *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 8615.
- Cermak, S. C.; Isbell, T. A.; *Ind. Crops Prod.* **2002**, *15*, 145.
- Lutisan, J.; Cvengros, J.; *Chem. Eng. J.* **1995**, *56*, 39.
- Cvengros, J.; Pollak, S.; Micov, M.; Lutsan, J.; *Chem. Eng. J.* **2001**, *81*, 9.
- Wang, S.; Gu, Y.; Liu, Q.; Yao, Y.; Guo, Z.; Luo, Z.; Cen, K.; *Fuel Process. Technol.* **2009**, *90*, 738.
- Shao, P.; Jiang, S. T.; Ying, Y. J.; *Food Bioprod. Process.* **2007**, *85*, 85.
- Fregolente, P. B. L.; Pinto, G. M. F.; Wolf Maciel, M. R.; Maciel Filho, R.; Batistella, C. B.; *Quim. Nova* **2009**, *160*, 1539.
- Tovar, L. P.; Wolf Maciel, M. R.; Pinto, G. M. F.; Maciel Filho, R.; Gomes, D. R.; *Chem. Eng. Res. Des.* **2010**, *88*, 239.
- Liu, K.; Chen, Q.; Liu, Y.; Zhou, X.; Wang, X.; *J. Food Sci.* **2012**, *77*, C1156.
- Olmedo, R.; Nepote, V.; Grosso, N. R.; *Food Chem.* **2014**, *156*, 212.
- Barros Neto, B.; Scarmínio, I.; Bruns, R.; *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 3ª ed., UNICAMP: Campinas, 2007.
- Statsoft, Inc.; *Statistica* (data analysis software system), version 7. Tulsa, USA.
- Cascon, V.; Gilbert, B.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 773.
- Martins, P. F.; Batistella, C. B.; Maciel Filho, R.; Wolf Maciel, M. R.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 753.
- Migowska, N.; Stepnowski, P.; Paszkiewicz, M.; Golebiowski, M.; Kumirska, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3029.
- Adams, P. R.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.
- Pinto, A. C.; Braga, W. F.; Rezende, C. M.; Garrido, F. M. S.; Veiga Junior, V. F.; Bergter, L.; Patitucci, M. L.; Antunes, O. A. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 355.
- Van Den Berg, K. J.; *Analysis of diterpenoid resins and polymers in paint media and varnishes: with an atlas of mass spectra*. FOM Institute AMOLF: Amsterdam, 2012.
- Leandro, L. M.; de Souza Vargas, F.; Barbosa, P. C. S.; Neves, J. K. O.; da Silva, J. A.; Veiga Junior, V. F.; *Molecules*, **2012**, *17*, 3866.
- Silva, E. S.; Mathias, C. S.; Lima, M. C. F.; Veiga Junior, V. F.; Rodrigues, D. P.; Clement, C. R.; *Pesqui. Agropec. Bras.* **2012**, *47*, 1621.